

**Die Rolle des PPAR- α -Rezeptors
auf die Inflammationsreaktion
während ischämischer Kardiomyopathie
im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vanessa Isabelle Arnoldi

aus Bergisch-Gladbach

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Daniel Dürr
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jan Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.03.2017

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Armin Welz

*„Zwei Dinge sollen Kinder von ihren Eltern bekommen:
Wurzeln und Flügel.“
(Johann Wolfgang Goethe)*

Für meinen Sohn Jonas Leonard.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	8
2.	Einleitung.....	11
2.1	Koronare Herzkrankheit	11
2.2	Ischämie und Reperfusion.....	13
2.3	Kurzzeitige Myokardischämie.....	14
2.3.1	„Ischämische Präkonditionierung“	14
2.3.2	„Myocardial Stunning“	14
2.4	„Hibernierendes Myokard“.....	15
2.4.1	„Short-term hibernation“	17
2.5	Mausmodelle	17
2.6	Ventrikuläre Dysfunktion	18
2.7	Metabolismus im hibernierenden Myokard.....	19
2.8	Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptoren“ (PPAR's)	20
2.8.1	Molekulare Grundlagen und Funktionen	20
2.8.2	„Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α “ (PPAR- α)	23
2.9	Arbeitshypothese.....	23
3.	Material & Methoden	24
3.1	Tiermodelle: Gruppendefinitionen der Versuchstiere.....	24
3.2	Wildtypmäuse.....	24
3.3	MHC-PPAR- α Mäuse	25
3.4	Protokoll der Initialoperation: Implantation der LAD-Ligatur.....	25
3.5	Ischämie- und Reperfusionsprotokoll.....	28
3.6	Entnahme der Mäuseherzen	30
3.7	Echokardiographische Messung der ventrikulären Pumpfunktion	31
3.8	Histologische Methoden	32

3.8.1	Methode zur histologischen Fixierung.....	32
3.8.2	Auswahl der Präparate am H.E.-Schnitt.....	33
3.8.3	Allgemeines Vorgehen bei histologischen Färbungen	33
3.8.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	34
3.8.5	Sirius-Rot-Färbung, Kollagenfärbung.....	35
3.8.6	PAS-Färbung zum Anfärben von Glykogen	36
3.9	Immunhistochemische Methoden.....	37
3.9.1	α SMAC Färbung der glatten Muskelzellen.....	37
3.9.2	Mac-2-Färbung zur Detektierung von Makrophagen.....	38
3.10	Auswertung der histologischen Untersuchungen	40
3.10.1	Planimetrische Kollagenauswertung	40
3.10.2	Zellzählung der Mac-2 positiven Makrophagen.....	41
3.11	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.11.1	mRNA-Isolation aus Mäuseherzen.....	42
3.11.2	Synthese der cRNA-Sonde aus isolierten mRNA-Proben mittels reverser Transkription.....	45
3.11.3	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	47
3.11.4	Theoretischer Hintergrund.....	48
3.11.5	Durchführung der Taqman [®] RT-qPCR.....	49
3.11.6	Auswertung der Messergebnisse	51
3.12	Statistische Auswertung	51
4.	Ergebnisse	52
4.1	Versuchstiere	52
4.2	Regulation von PPAR- α	53
4.3	Pathomorphologische Befunde	54
4.4	Interstitielle Glykogenakkumulation.....	55
4.5	Apoptose und antioxidativer Schutz während repetitiver I/R.....	56

4.6	Linksventrikuläre Pumpfunktion.....	59
4.7	Inflammatorische Reaktion im ischämischen Myokard.....	62
4.8	Initiierung und Modulation der Inflammation.....	64
4.9	Fibrosebildung.....	67
4.10	Myofibroblastendifferenzierung und Gewebeumbau.....	68
5.	Diskussion.....	72
5.1	Mausmodell der repetitiven I/R.....	74
5.2	Die Rolle des PPAR- α in der Regulation des myokardialen Metabolismus während repetitiver Ischämie und Reperfusion.....	76
5.3	Kardiomyozytäre Adaptationsmechanismen – oxidativer Schutz und Adaptation der kontraktilen Elemente.....	76
5.4	Initiierung des Entzündungsprozesses.....	77
5.5	Die PPAR- α -Überexpression führt zum prolongierten Gewebeumbau.....	79
5.6	Limitation der Arbeit.....	80
5.7	Zusammenfassung.....	81
6.	Ausblick.....	83
7.	Verzeichnis der Abbildungen.....	84
8.	Tabellenverzeichnis.....	86
9.	Literaturverzeichnis.....	87
10.	Danksagung.....	97

1. Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer
ACS	Akutes Koronarsyndrom
α -SMAc	Alpha-Smooth-Muscle-Actin
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AWT	Vorderwandverdickung („anterior wall thickening“)
bFGF	basic-Fibroblast-Growth-Factor
cDNA	complementary, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	complementary, komplementäre RNA
CCL2	chemokine ligand 2 = Chemokinligand 2 = MCP-1
DAB	Diaminobenzol-Färbung
d	„day“ = Tag
DEPC-ddH ₂ O	Diethylprocarbonat mit doppelt behandeltem deionisiertem Wasser
di-H ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpBS	Dulbeccos-Phosphat-Buffered-Saline
EC-SOD	extracellular superoxide dismutase mice
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EtOH	Ethanol
FS	Fraktionsverkürzung („fractional shortening“)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-Triphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCOOH	Formaldehyd
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMOX-1	Hämoxigenase 1
HSI-Anpassung	H = hue, Farbton; S = saturation, Sättigung; I = intensity, Lichtintensität
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1

IE	Internationale Einheiten
IL-1 β	Interleukin-1- β
IL-6	Interleukin-6
I/R	Ischämie und Reperfusion
KCl	Kalium-Chlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDA	Left anterior descending coronary artery = LAD
LDL	Low Density Lipoprotein
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Druck
MCP1	monocyte chemotactic protein 1 = CCL2
MHC	myosin heavy chain, Myosin schwere Ketten
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt
NTG	Nitroglycerin
OPN	Osteopontin
PCR	Polmerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Polyethylen
PET	Positionsemissionstomographie
P _i	Phosphat
PPAR- α	Peroxisom Proliferator –aktivierter Rezeptor- α
PPARE	PPAR-response Elemente
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RAC-1	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease (Nuklease, die Hydrolyse von RNA katalysiert)
ROS	reactive oxygene species

RPA	RNA Protection Assay
RXR	retenoid X receptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SODs	Superoxiddismutasen
SR	Sirius Rot
TNC	Tenascin-C
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha Vascular-Endothelium-Growth-Factor
T-Test	Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße. Ein-/Zwei-Stichprobentest
VW _{diast}	Ventrikel-Durchmesser während der Diastole
VW _{syst}	Ventrikel-Durchmesser während der Systole
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
Z-fix	Zink-Formalin-Lösung
*	Signifikanzniveau $p < 0,05$

2. Einleitung

2.1 Koronare Herzkrankheit

Epidemiologisch stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrieländern dar (Ruiz & Soler, 2010). Laut World Health Organisation (WHO) starben im Jahr 2012 17,5 Millionen Menschen weltweit an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen (Zitat: Mozaffarian et al., 2015).

Zu den Hauptrisikofaktoren, vorzeitig an einer artheroklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit (KHK) zu erkranken, zählen Diabetes mellitus, ein erhöhtes Low-Density-Lipoprotein-(LDL-)Cholesterin, die arterielle Hypertonie und Nikotinabusus (International Atherosclerosis Society, 2007). Diabetes mellitus stellt hierbei eine der wichtigsten Komorbiditäten – und einen prädisponierenden Faktor – im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Asghar et al., 2009; Duerr et al., 2014a). Nichtsdestotrotz sind die Pathophysiologie des diabetischen Herzens und seine Anpassungsfähigkeit im ischämischen Myokard bislang nur unzureichend erforscht (Duerr et al., 2014a).

Akute koronare Ereignisse treten meist unerwartet auf und enden häufig tödlich, bevor medizinische Hilfe geleistet werden kann. Die steigende Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen macht die zunehmende Wichtigkeit einer individuellen Risikostratifizierung der Patienten und einer darauf abzielenden optimierten Therapie deutlich.

Ätiologisch liegt der KHK eine atherosklerotische Veränderung der Koronararterien zugrunde. Die Atherosklerose beginnt mit einer Schädigung der arteriellen Intima. Morphologisch ist der Lipidstoffwechsel gestört und es kommt zur vermehrten Ablagerungen von Lipiden. Bei einer Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen führt die Verkalkung dieser Plaques schließlich zur Versteifung der Gefäßwand (Rassow et al., 2008) und zu einer progressiven Koronarstenose und dadurch zu ischämischen Episoden am Myokard, was eine schleichende Veränderung der ventrikulären Pumpfunktion zur Folge hat (Heusch, 1998). Bei psychischer oder körperlicher Belastung bemerkt der Patient in diesem Stadium charakteristische retrosternale Schmerzen, die Ausdruck einer Angina pectoris-Symptomatik sind (Heusch, 1998). Bei

psychischer oder körperlicher Belastung bemerkt der Patient in diesem Stadium charakteristische retrosternale Schmerzen, die Ausdruck einer Angina pectoris-Symptomatik sind.

Primärpräventiv gilt es vor Auftreten einer arteriosklerotisch bedingten Gefäßerkrankung zu intervenieren, um nachfolgende kardiovaskuläre Komplikationen zu vermeiden. Eine Gewichtsreduktion, die Beendigung des Rauchens, der Verzicht auf Alkohol und diätetische Ernährungsumstellung sowie regelmäßige sportliche Aktivitäten stellen empfehlenswerte primärpräventive Lebensstilveränderungen dar. Das Ziel sekundärpräventiver Maßnahmen ist es, beim Vorhandensein von KHK und Atherosklerose Myokardinfarkte oder Re-Infarkte zu verhindern, indem man das individuelle Risiko eines Patienten mit manifester Herz-Kreislauf-Erkrankung medikamentös, interventionell oder offen chirurgisch therapiert. Im Rahmen der medikamentösen Therapie wird aktuell mit fünf Wirkstoffklassen therapiert: Beta-Blocker zur Optimierung der Herzleistung, ACE-Hemmer zur Einstellung der Hypertonie, Statine zur lipidsenkenden Therapie, Diuretika sowie Thrombozytenaggregationshemmer (Aspirin). Diese Medikamente werden oft noch durch Nitrate wie Nitroglycerin, Kalziumkanalblocker – und im Falle von Diabetes mellitus – auch durch Antidiabetika ergänzt (International Atherosclerosis Society, 2007). Nicht-chirurgisch-invasiv sollte nach der Maxime „time is muscle“ frühestmöglich, d. h. innerhalb der ersten sechs Stunden nach dem Infarkt-Ereignis, mittels Gabe von Fibrinolytika interveniert werden. Der Goldstandard bei stenosierten Koronararterien ist jedoch die frühzeitige Revaskularisation der betroffenen Herzkranzgefäße durch entweder die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) mit Ballondilatation und meist nachfolgender Stentimplantation oder die Bypass-Operation.

Ziel dieser Therapieoptionen ist es, den Erhalt einer ausreichenden ventrikulären Pumpfunktion zu gewährleisten. Die terminale Herzinsuffizienz ist nach wie vor eine gefürchtete Komplikation der KHK, deren alleinige lebensverlängernde Therapieoption die Herztransplantation darstellt.

2.2 Ischämie und Reperfusion

Einem verstärkten Gewebeuntergang wird mit der rechtzeitigen Reperfusionstherapie entgegengewirkt, um einer progressiven Schädigung mit terminal irreversibler Gewebenekrose vorzubeugen.

Tierexperimentelle Studien von Jennings et al. an Hunden zeigten, dass auch nach einer 15-minütigen kompletten Ischämie Kardiomyozyten noch vital waren. Nach Reperfusion des ischämischen Areals konnte ein Myokardinfarkt und damit der Untergang der Integrität des Gewebes mit allen zellulären, metabolischen und kontraktile Funktionen verhindert werden (Jennings et al., 1960; Jennings et al., 1985). Überschritt die Ischämie-Zeit 15 Minuten, wurden vermehrt Kardiomyozyten irreversibel geschädigt, was durch Reperfusion nicht mehr positiv beeinflusst wurde (Reimer et al., 1993). Nach einer 40-minütigen totalen Ischämieperiode waren zunehmend nur noch irreversibel geschädigte Kardiomyozyten im subendokardialen Areal nachweisbar (Jennings et al., 1960; Jennings et al., 1985). In medialen und subepikardialen Bereichen erkannte man nach Reperfusion hingegen noch vitales Gewebe.

Diese tierexperimentell erlangten Resultate verdeutlichen, dass Reperfusion noch nicht irreversibel geschädigte Kardiomyozyten vor Zelltod bewahren kann und die transmurale Ausdehnung eines Infarktes, in Abhängigkeit von der vorangegangenen Ischämiezeit, limitiert wird. Das entscheidende Kriterium ist hierbei die Dauer der Ischämie bis zur Wiederherstellung der Durchblutung sowie die Reperfusion (Birnbaum et al., 1997).

Es ist bekannt, dass Reperfusion die Wundheilung und den kardialen Gewebeumbau positiv beeinflusst. Die natürlicherweise nach dem Infarkt initiierte inflammatorische Reaktion in den ischämischen Zonen setzt charakteristischerweise nach Reperfusion beschleunigt und verstärkt ein (Entman & Smith, 1994) und hat zudem einen positiven Einfluss auf den ventrikulären Gewebeumbau (Entman et al., 2000) des Herzens.

2.3 Kurzzeitige Myokardischämie

Ein Versuch, den Einfluss kurzzeitiger Ischämie-Episoden auf das Myokard zu beschreiben, wurde in den letzten Jahren mit den Modellen der „ischämischen Präkonditionierung“, des „myokardialen Stunning“ und des „hibernierenden Myokards“ unternommen. Die ischämische Präkonditionierung sowie die kurzzeitige Myokard-Hibernation haben hierbei kardioprotektive Effekte.

2.3.1 „Ischämische Präkonditionierung“

Ischämische Präkonditionierung (engl.: „Preconditioning“) beschreibt den tierexperimentell erforschten kardioprotektiven Effekt repetitiver kurzer Ischämie-Episoden (1 bis 5 Minuten) mit anschließender Reperfusion, die einem prolongierenden ischämischen Insult vorausgehen (Murry et al., 1986). Es vermindert die Ausbreitung der Infarktgröße durch eine zeitliche Abfolge aus mehreren kurzen Episoden von Ischämie und Reperfusion (I/R). Nach abgeschlossener I/R-Episode werden weder histopathologische Veränderungen am Myokard noch eine Verschlechterung der ventrikulären Pumpfunktion beobachtet. Trotzdem vermutet man reversible kurzzeitige intrazelluläre Veränderungen, die sich innerhalb von Minuten normalisieren. Ischämische Präkonditionierung stellt bislang den stärksten bekannten protektiven in-vivo-Mechanismus des Herzens bezüglich ischämischer Gewebeschädigungen dar.

2.3.2 „Myocardial Stunning“

Kloner et al. beschrieben das Phänomen des „Myocardial Stunning“ als einen Zustand reversibler kontraktile Dysfunktion, der durch repetitive, kurz aufeinander folgende 15-minütige I/R-Zyklen ausgelöst wurde (Kloner et al., 2001; Kloner & Jennings, 2001a, 2001b) und über mehrere Tage andauern konnte (Kloner et al., 1998). Histomorphologisch sind nur ultrastrukturelle Veränderungen des Myokards nachweisbar (Schaper, 1990). Als pathogenetische Erklärungsmodelle der reversiblen kontraktile Dysfunktion dienen die myozytäre Kalziumüberladung und die verminderte Kalziumsensitivität, ver-

ursacht durch eine vermehrte Freisetzung und dadurch bedingte myozytäre Überladung potenziell zytotoxischer Sauerstoffradikale (Bolli & Marban, 1999; Kloner et al., 1998). Diese reversible kontraktile Dysfunktion wurde auch beim Menschen beschrieben, z. B. nach Kardioplegie bei Bypassoperationen oder nach PTCA, und war durch die Gabe von Dobutamin nicht positiv beeinflussbar (Allen et al., 1996; Gerber et al., 1999; Kloner et al., 2001; Kloner & Jennings, 2001a, 2001b; Patel et al., 1988).

2.4 „Hibernierendes Myokard“

Hibernation bezeichnet ein Phänomen des reduzierten Energieaufwandes bei vermindertem Energie-Angebot, vergleichbar mit dem physiologischen Zustand bei Winterschläfern. Unter „Hibernierendem Myokard“ (engl.: „Hibernation Myocardium“) versteht man eine adaptive Reduktion der myokardialen kontraktile Funktion als Antwort auf einen verminderten myokardialen Blutfluss. Hibernierendes Myokard wird als ein regulatorischer Prozess betrachtet, der dazu dient, ein energetisches Defizit zu vermeiden und die myokardiale Integrität aufrechtzuerhalten (Diamond et al., 1978; Heusch, 1998). Der Zustand des „funktionellen Winterschlafs“ ist demnach reversibel (Rahimtoola, 1982). Nach chirurgischer Revaskularisation durch Bypassoperationen oder PTCA verbessert sich die myokardiale Pumpfunktion und nähert sich ursprünglichen Ejektionsfraktionen an (Rahimtoola, 1982, 1985, 1989). Dies macht die wichtige therapeutische Konsequenz der frühen adäquaten Revaskularisation verständlich.

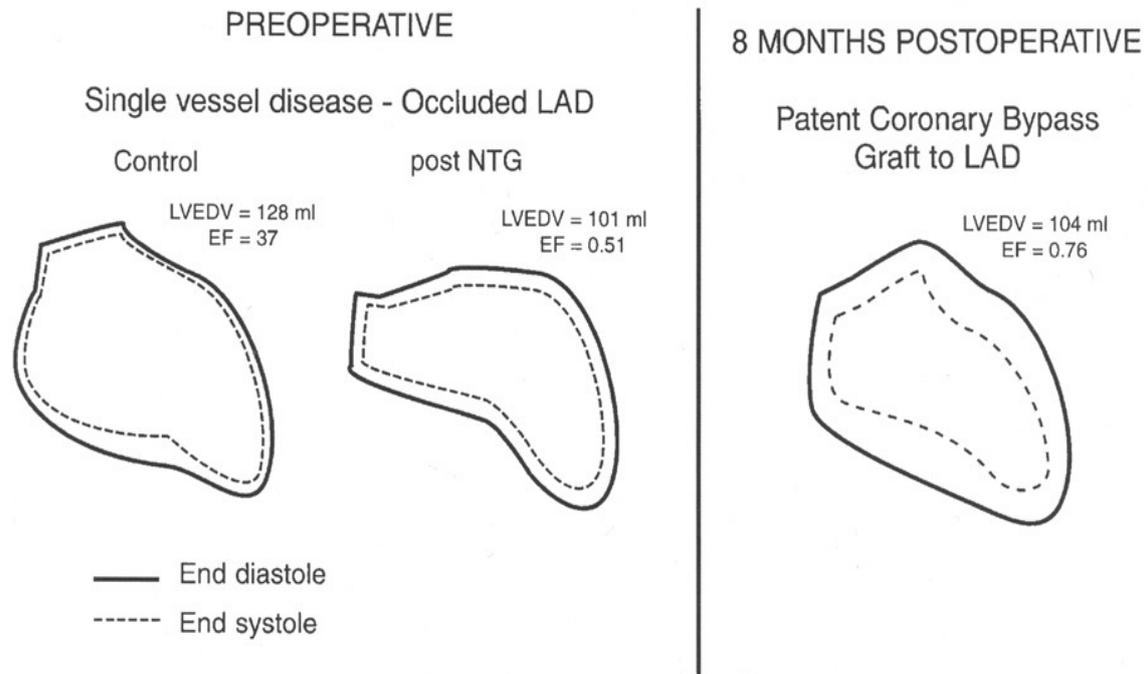


Abb. 1: Ventrikulogramm

Enddiastolische und endsystolische schematische Darstellung des linken Ventrikels eines Patienten mit totaler Okklusion des „left anterior descending coronary artery“ (LAD) = Ramus interventricularis anterior (RIVA) und hibernierendem Myokard, ohne Ausbildung eines Myokardinfarktes.

Präoperative Untersuchungen (Control) wiesen eine reduzierte Ejektionsfraktion von 0,37 und eine teilweise akinetische anteroapikale Wand auf. Nach der Gabe von Nitroglycerin (NTG) verbesserte sich die Wandbewegung und die Ejektionsfraktion (EF) stieg auf 0,51. Eine acht Monate nach chirurgischer Bypass-Operation durchgeführte Kontrolle zeigte, dass der Patient nach Revaskularisation eine normale ventrikuläre Kontraktions-Funktion und EF von 0,76 erreichte. LEVDV, linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; LAD „left anterior descending coronary artery“ (modifiziert nach Rahimtoola et al. (Rahimtoola, Circulation, 1982)).

2.4.1 „Short-term hibernation“

Die „short-term hibernation“ stellt im Sinne des „perfusion-contraction-matching“ (Ross, 1991) die reversible Adaptation der Kontraktilität des Herzens an eine progrediente Reduktion des Blutflusses dar (Przyklenk et al., 1992; Shen & Vatner, 1995).

Als histopathologische und ultrastrukturelle Veränderungen während der Myokardhibernation werden die interstitielle Kollageneinlagerung, der Verlust des sarkoplasmatischen Retikulums, die intrazelluläre Glykogeneinlagerung sowie eine Verkleinerung der Mitochondrien beschrieben (Michael et al., 2002). Zudem scheint die Struktur des Zytoskeletts mit dessen Proteinen Desmin, Tubulin und α -Aktin desorganisiert zu werden und es zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix mit Ablagerung von Kollagen, Fibronectin, Tenascin und Laminin zu kommen (Ausma et al., 1995a, 1995b, 1995c; Borgers et al., 1993; Elsasser et al., 1995, 1997). Letzteres ist charakteristisch für die Pathogenese der Fibrose.

Die Relevanz der therapeutischen Revaskularisation kommt darin zum Ausdruck, dass Patienten mit hibernierendem Myokard, die keinen chirurgischen Maßnahmen der Revaskularisation zugeführt wurden, einem hohen Mortalitätsrisiko unterliegen (Allman et al., 2002).

2.5 Mausmodelle

Um die Myokardhibernation besser begreifen zu können, stehen vor allem Kleintiermodelle im Mittelpunkt der Forschungsbemühungen. Zum Beispiel an der Maus oder der Ratte lassen sich vor allem funktionale mechanisch-zellbiologische Parameter besser untersuchen als an Großtiermodellen. Als Großtiermodelle dienten beispielsweise Schweine und Hunde (Michael et al., 1979; Schaper et al., 1969). Diese sind jedoch aufgrund des Auftretens erhöhter Apoptoseraten bei Schweinen sowie bestehenden nativen Kollateralgefäßen im Hundeherzen (Camici et al. 1997, Fallacollita et al., 2001) verlassen worden. Aufgrund der teilweise am Menschen ethisch nicht vertretbaren Versuche scheidet auch dieses Versuchsmodell aus.

Das von uns verwendete Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion wurde von Michael et al. im Labor des Baylor College of Medicine in Houston, Texas, USA entwickelt (Michael et al., 1995). Um die inflammatorische myokardiale Reaktion untersuchen zu können, wurde in einer „open-chest“-Operation eine Ligatur um den left anterior descending coronary artery (LAD) gelegt, der als Hauptversorgungsast des linken Ventrikels beschrieben wurde. Das Gefäß wurde für 30 Minuten, 1 Stunde oder permanent okkludiert und anschließend eine Reperfusion durch Entfernung der Schlinge erreicht.

Dieses Mausmodell wurde von Nossuli et al. (Nossuli et al., 2001) modifiziert, um den Einfluss des initialen chirurgischen Traumas von der Pathophysiologie des eigentlichen I/R-Ereignis unterscheiden zu können. Dabei wurde in einer initialen Operation die Ligatur des LAD angebracht, durch die Thoraxwand gezogen und in subkutanen Taschen verstaut. Nach Thoraxverschluss und anschließender Hautnaht konnten sich die Tiere 3 Stunden bis 1 Woche erholen („closed-chest“-Modell), um anschließend nach erneuter Eröffnung der Hautnaht, Freilegung der Ligatur und Zusammenziehen der Schlinge eine Okklusion des LAD zu erzielen. Die auf die induzierte Ischämie folgende Reperfusion wurde durch das Entfernen der Ligatur erreicht.

Dewald et al. (Dewald et al., 2003) haben dieses Modell weiterentwickelt, damit die Ischämie und Reperfusion beliebig oft wiederholt werden konnte. In diesem Modell der repetitiven I/R entsteht im Rahmen der dadurch erzielten ischämischen Kardiomyopathie eine interstitielle Fibrose in Abwesenheit von Myokardinfarkt, die mit dem hibernierenden Myokard beim Menschen wegen der Reversibilität der ventrikulären Dysfunktion vergleichbar ist. In der vorliegenden Dissertation wird dieses Modell der repetitiven I/R angewandt und die untersuchten Mäuse-Herzen werden auf histopathologische, funktionelle und molekularbiologische Veränderungen überprüft.

2.6 Ventrikuläre Dysfunktion

Der Verlust der Kontraktilität des Myokards entsteht schnell und korreliert in Ausmaß und Lokalisation direkt mit der regionalen myokardialen Ischämie (Heusch, 1998). Die

ischämisch bedingte inflammatorische Reaktion begünstigt den Gewebeumbauprozess, kann aber gleichzeitig zu einer starken interstitiellen Fibrose führen, welche die ventrikuläre Herzfunktion einschränken kann (Frangogiannis et al., 1998b). Interstitielle Fibrose ist charakterisiert durch eine vermehrte Ablagerung von Kollagen, was durch eine verstärkte Differenzierung kollagenbildender Myofibroblasten hervorgerufen wird. Einhergehend mit der Verhärtung des Myokardskeletts und dem Verlust von Kardiomyozyten ist die ventrikuläre Dysfunktion ein wesentliches Merkmal der ischämischen Kardiomyopathie.

2.7 Metabolismus im hibernierenden Myokard

Bei chronisch reduziertem Blutfluss oder nach repetitiven kurzen Episoden der myokardialen I/R kann eine reversible kontraktile Dysfunktion nachgewiesen werden, die mit einem Anstieg des Glukoseverbrauchs im Herzen einhergeht (Dewald et al, 2003; Schulz & Heusch, 2000). Dieses Phänomen entspricht der myokardialen Hibernation. In den ersten 5 Minuten der akuten koronaren Stenose sinken der koronar-venöse pH-Wert und das Laktat im koronar-venösen Blut, wohingegen der koronar-venöse PCO_2 ansteigt (Fedele et al., 1988). In einem „open chest“-Modell an Schweinen konnte bislang ein früher Anstieg der myokardialen Laktatproduktion nach einer „short-term hibernation“ mit progredienter Reduktion des Blutflusses über 24 Stunden aufgezeigt werden, gefolgt von einem Abfall zu annähernd normalen Werten während kontinuierlicher Ischämie (Chen et al., 1996). Die pathophysiologische Herkunft der Laktatproduktion im „short-term hibernating myocardium“ ist auch heute noch nicht genau erforscht. Die funktionelle Konsequenz einer verminderten Laktatproduktion resultiert in einer Azidose und damit in einer ventrikulären Dysfunktion.

Eine nachweisliche Verbesserung der Glukoseaufnahme beobachtete man bei Schweinen in einem Modell 24-stündiger koronarer Hypoperfusion (Chen et al., 1995, 1996) sowie in Schweinen mit chronischer Stenose der Koronararterien und permanenter Reduktion der myokardialen Durchblutung (Fallavollita et al., 1997). In einer Studie der 4-tägigen Koronarstenose an Schweinen konnte die Verminderung der Fettsäureoxidati-

on und ein Anstieg des Glukoseverbrauchs gezeigt werden (Liedtke et al., 1995; Schwaiger et al., 1985a, 1985b).

Abhängig von den pathophysiologischen Umständen kann die Substratutilisation im erwachsenen Herzen zwischen Fettsäuren und Glukose variieren, um dem entsprechenden benötigten Energieaufwand gerecht werden zu können (Finck et al., 2002; Neely et al., 1972). Dieser flexible Substratwechsel ist im diabetischen Herzen aufgrund einer insulininduzierten Dysregulation der myokardialen Glukoseaufnahme und -Verwertung nur noch eingeschränkt möglich (Finck et al., 2002). Im unkontrollierten diabetischen Herzen werden vornehmlich mitochondriale Fettsäuren zur ATP-Generation verwendet (Finck et al., 2002; Neely et al., 1972), einhergehend mit einer vermehrten kardialen Sauerstoffausschöpfung und damit auch einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: „reactive oxygene species“ (ROS))-Produktion, verursacht durch den hohen mitochondrialen Durchfluss (Finck et al., 2002, 2003, 2007). Eine hyperglykämische und hyperlipidämische Umgebung im diabetischen Herzen führt zur vermehrten Expression fettsäurenmetabolisierender Proteine. Mit fortschreitendem Diabetes überschreitet die Aufnahme von Fettsäuren die Kapazität der Fettsäureoxidation im Herzen. Dies führt schließlich zu einer myokardialen Lipidakkumulation, die durch die vermehrte Synthese von ROS (oxidativer Stress) eine myokardiale Dysfunktion und das Absterben wertvoller Kardiomyozyten zur Folge hat (Lopaschuk et al., 1989; Zhou et al., 2000). Dieses Phänomen der Korrelation von Lipidakkumulation im Herzen und Apoptose der Myozyten wird als Lipotoxizität bezeichnet (Zhou et al., 2000).

2.8 „Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptoren“ (PPAR's)

2.8.1 Molekulare Grundlagen und Funktionen

Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR's) sind spezifische, ligandengesteuerte nukleäre Transkriptionsfaktoren, die zu der Überfamilie der Steroidrezeptoren gezählt werden (Isseman & Green, 1990). Eine Anreicherung der PPAR's im Nukleolus führt zu einer ligandengesteuerten Genexpression. Die PPAR's interagieren zunächst

mit dem „retenoid X receptor“ (RXR) als heterodimerer Komplex, um anschließend das „PPAR-response Elemente“ (PPARE's = PPRE) an der Promotorregion der abzulesenden DNA-Zielsequenz erkennen zu können (Schoonjans et al., 1996) (siehe Abb. 2). Es existieren verschiedene Isoformen der RXR's: RXR- α , - β und - γ , die als wichtiges Bindepotein durch die 9-cis-Retinoinsäure aktiviert werden (Kliwer et al., 1992) und unter anderem den Lipidstoffwechsel und den Glukosemetabolismus modulieren. PPAR's sind zudem an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung, der Apoptose und auch an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt (Chinetti et al., 2000).

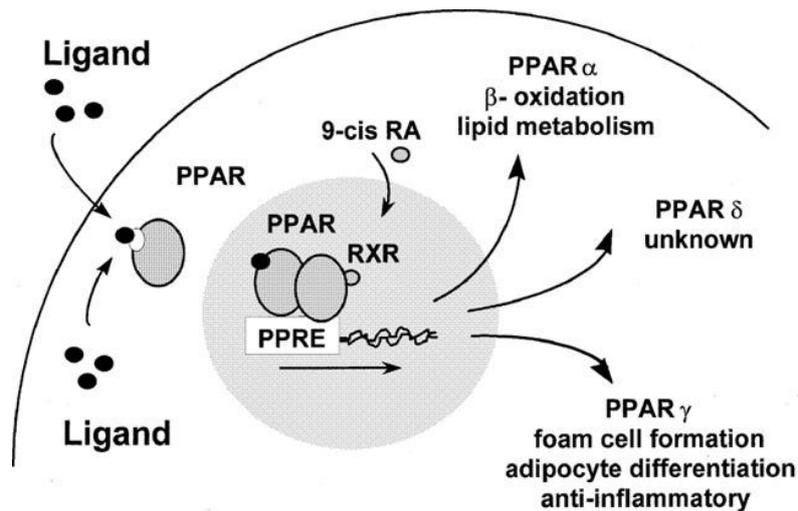


Abb. 2: Schema der Aktivierung der PPAR's-Rezeptoren nach Bishop-Bailey et al. (Bishop-Bailey et al., 2000)

PPAR's = Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren, PPRE = Peroxisom Proliferator response Elemente, RXR = retenoid X receptor, 9-cis RA = 9-cis-Retinoinsäure.

Als Subtypen der PPAR's sind bislang PPAR- α , - β/δ und - γ identifiziert (Tyagi et al., 2011), die durch eine unterschiedliche Gewebeverteilung charakterisiert sind und jeweils von einem separaten Gen kodiert werden (Grannemann et al., 1998). Natürliche Liganden der PPAR's sind unter anderem Fettsäurederivate, Eicosanoide, Prostaglandine und Leukotrien B4 (Forman et al., 1995).

2.8.2 „Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α “ (PPAR- α)

PPAR- α wird vor allem in der Herz- und Skelettmuskulatur sowie in den Nieren und der Leber exprimiert (Bishop-Bailey, 2000), in denen es zentrale Prozesse im Fettsäurestoffwechsel reguliert (Peters et al., 1997). Zudem konnte dieser Subtyp in der Gefäßwand sowie in Monozyten/Makrophagen (Chinetti et al., 1998) nachgewiesen werden, wobei dessen Aktivierung zu einer Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität führt (Jiang et al., 1998). Außerdem wird ihm eine Schlüsselrolle in der Regulation und Dauer von antiinflammatorischen Prozessen zugeordnet, da in tierexperimentellen Studien mit PPAR- α defizienten Mäusen eine verlängerte Immunantwort auf Entzündungsreize gezeigt werden konnte (Devehand et al., 1996).

PPAR- α reguliert die Expression von fast allen Proteinen und Enzymen, die an der Aufnahme der löslichen Fettsäuren in das Zielgewebe und deren Oxidation beteiligt sind (Bager & Kelly, 2000), und moduliert ferner die Substratpräferenz im Herzen auf Transkriptionsebene während der akuten Ischämie (Dewald et al., 2005b). Zur effizienteren Energiegewinnung während der Ischämie oder infolge chronischer Druckbelastung des Myokards wird vermehrt Glukose und weniger Fettsäuren vom gestressten Herzen verstoffwechselt (Razeghi et al., 2001; Young et al., 2001). Dieser Substratwechsel wird unter anderem durch eine Herabregulation der PPAR- α Genexpression und der PPAR- α Aktivität induziert (Bager & Kelly, 2000). Viele Studien weisen darauf hin, dass die Herabregulation von PPAR- α vor myokardialer Dysfunktion schützt und korrespondierend eine PPAR- α Aktivierung zu myokardialer Dysfunktion führt (Dewald et al. 2005b; Finck et al., 2002; Young et al., 2001). PPAR- α scheint nicht nur in der Modulation inflammatorischer Prozesse involviert zu sein, sondern auch die ROS-Produktion unter I/R zu beeinflussen (Dewald et al., 2005b; Sharifpanah et al., 2008).

2.9 Arbeitshypothese

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der kardiomyozytenspezifischen PPAR- α Überexpression im Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie zu untersuchen.

Im Mausmodell der I/R konnten wir bereits zeigen, dass die durch die Herabregulation von PPAR- α verursachte Änderung der Substratverwertung von Fettsäuren zu Glukose einen protektiven Mechanismus des Herzens darstellt, der die Entstehung von Inflammation und Fibrose im Herzen vermindert und die Energieeffizienz des Herzens verbessert (Dewald et al., 2005b). Außerdem wurde beschrieben, dass durch die Aktivierung von PPAR- α mit dem Agonisten WY-14,643 im Mausmodell der repetitiven, kurzen I/R die Entstehung einer irreversiblen ventrikulären Dysfunktion verursacht wird (Dewald et al., 2005b). Andere Studien mit Verwendung von PPAR- α Agonisten diskutieren einen kardioprotektiven Einfluss von PPAR- α Agonisten. Diese kontroversen Studien haben die Gemeinsamkeit, dass sie Agonisten verwenden; dies reflektiert die Schwierigkeiten der pharmakologischen Einflussnahme mit Problemen wie Partialantagonismus, Rezeptorspezifität, Dosisabhängigkeit, Löslichkeit/Galenik und Nebenwirkung von Lösungsmitteln. (Bulhak et al., 2006; Devchand et al., 1996; Hafstad et al., 2009; Yue et al., 2003; Wayman et al., 2002).

Um diese potentiellen Probleme bei der pharmakologischen Einflussnahme auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer PPAR- α Überexpression (Expression von PPAR- α unter dem α -myosin heavy chain (MHC, auch Myosin-6) Promotor) verwendet (Finck et al., 2002). Diese Tiere werden im folgenden MHC-PPAR- α Mäuse genannt. Am Modell der repetitiven I/R wurden die ventrikuläre Funktion, der Glykogengehalt, die Apoptose und die inflammatorische Reaktion im ischämischen Mäuseherzen untersucht.

3. Material & Methoden

3.1 Tiermodelle: Gruppendifinitionen der Versuchstiere

Alle Mausexperimente wurden an 20–25 g schweren und 10–12 Wochen alten Mäusen den EU-Richtlinien 2010/63/EU für Tierversuche entsprechend durchgeführt.

3.2 Wildtypmäuse

Entsprechend der Behandlung, der die WT-C57BL/6J-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) unterworfen wurden, wurden sie in folgende Gruppen eingeteilt:

Nativmäuse

Den Nativmäusen wurde das Herz chirurgisch entnommen, um histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen, ohne vorher ein chirurgisches Trauma zu setzen.

Kontroll-Mäuse (Sham)

Bei den Kontrollgruppen wurde die Initialoperation zur Anlage der LAD-Ligatur aber kein darauf folgendes I/R-Protokoll durchgeführt. Mäuse der Kontrollgruppe wurden 7 Tage nach der Initialoperation (0-Tage-Kontrollgruppe) geopfert und das Herz wurde entnommen. Um eine unerwünschte Induktion der Chemokine und Zytokine durch das Trauma der Initial-OP von einer späteren mRNA-Induktion durch ein I/R-Ereignis unterscheiden zu können, wurde die Untersuchung der mRNA an Tieren der Kontrollgruppe durchgeführt.

I/R-Mäuse

I/R-Mäuse wurden 7 Tage nach der initialen Operation täglich einem 15-minütigen Ischämie-Ereignis durch Verschluss des left anterior descending (LAD=„Ramus-Interventricularis-Anterior“ (RIVA)) unterzogen. Nach Wiedereröffnen des LAD wurden nach einem Reperusionsintervall von 3 Tagen und 7 Tagen die Herzen entnommen.

3.3 MHC-PPAR- α Mäuse

In der vorliegenden Studie wurden transgene Mäuse mit Überexpression von PPAR- α durch den spezifischen Promotor Myosin-6 (Myh6, oder α -MHC) basierend auf C57B1/6J (MHC-PPAR- α) verwendet (Finck et al., 2002). Diese Mäuse wurden freundlicherweise von Daniel P. Kelly (Sanford-Burnham Medica Research Institute, Orlando, FL, USA) zur Verfügung gestellt. Die MHC-PPAR- α -Expression war nachweislich 130-fach höher als in WT-Mäusen.

Die transgenen Versuchstiere wurden analog der WT-Tiere in die Gruppen Nativ, Kontrollgruppe sowie 3 und 7 Tage I/R eingeteilt.

3.4 Protokoll der Initialoperation: Implantation der LAD-Ligatur

Die Initialoperation erfolgte nach einem von Nossuli et al. entwickelten Mäusemodell der experimentellen myokardialen Ischämie und Reperfusion (Nossuli et al., 2001).

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion eines Natrium-Pentobarbital-Gemisches anästhesiert (10 μ g/g Körpergewicht). Dieses Gemisch bestand aus 1,8 ml Natrium-Pentobarbital (Nembutal, 50 mg/ml; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA), 4 ml 100% igem Ethanol (Aaper Co., Shelbyville, KY, USA) und aus 16 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA). Anschließend wurden die Versuchstiere am Thorax gründlich rasiert und in Rückenlage an den Extremitäten durch das Anbringen von Pflastern am Operationstisch fixiert. Mittels einer Rektalsonde wurde die Körpertemperatur erfasst und mithilfe einer Wärmelampe reguliert. Durch die Befestigung einer 3-0-Seidenfadenschlinge (Surgical Silk, Ethicon, Somerville, NJ, USA) an den Nagezähnen der Mäuse wurde durch angemessenen Zug eine Reklination des Nackens erreicht, um die nachfolgende Intubation zu erleichtern. Vor Beginn der Operation wurde die Haut mit der antiseptischen Lösung Betaisadona (Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn), Deutschland) desinfiziert. Der Hautschnitt wurde unter Sichthilfe eines Mikroskops (Stemi 2000-CS, Zeiss, Jena, Deutschland) medial vom Submentum bis zum Xiphoid gesetzt. Die Hautlappen wurden nach lateral präpariert, das peritracheale Fett-

gewebe und die darunterliegende Muskulatur wurden stumpf präpariert, um die darunterliegende Trachea freizulegen und unter Sicht intubieren zu können. Der aus Polyethylen (PE) bestehende PE-90-Tubus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) kam idealerweise in einem Abstand von 5–8 mm distal des Larynx zum Liegen und wurde in dieser Position fixiert (Abb. 3 A). Das freie Tubusende wurde über einen PE-160-Verbindungsschlauch mit dem Kleintier-Beatmungsgerät (Mini Vent Typ 845; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden. Hierüber wurde das Versuchstier mit 100 % igem Sauerstoff, einem Atemvolumen von 200 µl, bei einer Atemfrequenz von circa 110 Atemzügen pro Minute beatmet. Die suprasternalen Blutgefäße wurden vor und während der Thoraxeröffnung mit einem Mikroagulator verodet (Codman, Randolph, MA, USA).

Die Thorakotomie erfolgte links parasternal unter Durchtrennung der dritten bis fünften Rippen. Mit einer rechtseitigen und zwei linksseitigen 6-0 Prolene[®]-Nähten (Ethicon) wurde die Thoraxwand offengehalten, um nach stumpfer Präparation des Perikards die Sicht auf den LAD freizugeben (Abb. 3 B).

Die Ligatur um den LAD wurde mit einer Nadel 8-0 Prolene[®]-Naht (Ethicon) 1 bis 3 mm unterhalb des linken Atriums gelegt. Um den Abstand zwischen Ein- und Ausstichstelle so gering wie möglich zu halten und die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass außer dem LAD keine anderen Blutgefäße mit eingeschlossen wurden, wurde die Nadel zuvor U-förmig gebogen. Die Fadenenden der Ligatur wurden schließlich durch ein 0,5 mm langes Stück PE-10-Tubus gefädelt (Abb. 3 C), das zuvor für 24 Stunden in 100 %igem Ethanol desinfiziert worden war. Unter Zuhilfenahme von einer Kalt-Nadel der Größe 3 (Unimed, Lausanne, CH) wurden diese transthorakal ausgeführt, um anschließend in subkutanen Hauttaschen verstaut zu werden (Abb. 3 D).

Zuletzt wurde der Thorax mit vier 6-0 Prolene[®]-Nähten verschlossen, wobei besondere Vorsicht der rechten Lunge und der Arteria thoracica interna galt, um einen Pneumothorax oder Blutungen zu vermeiden. Vor dem Festziehen der letzten Naht wurde die Lunge durch kurzes Abklemmen des Tubus aufgebläht und die Beatmung beendet. Prophylaktisch wurde die Thoraxnaht vor Verschluss der Hautwunde mit dem Antibiotikum Cefazolin (MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Deutschland) behandelt, um einer Infektion vorzubeugen. Der Hautschnitt wurde danach mit einer 6-0 Prolene[®]-Naht wieder ver-

schlossen. Als Volumenersatz dienten 0,5 ml isotonische NaCl-Lösung, die intraperitoneal injiziert wurden. Zur postoperativen Schmerzprophylaxe wurde Buprenorphin (2 µg/g Körpergewicht; Reckitt & Beckiser, Public Limited Company, Slough, Vereinigtes Königreich) intraperitoneal injiziert, was nach 12 Stunden, einem Tag und zwei Tagen wiederholt wurde. Nach Extubation setzte die Spontanatmung unter Gabe von 100 %igem Sauerstoff schnell wieder ein, und die Tiere wurden bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins unter einer Wärmelampe beobachtet und zuletzt in den Käfig gelegt.

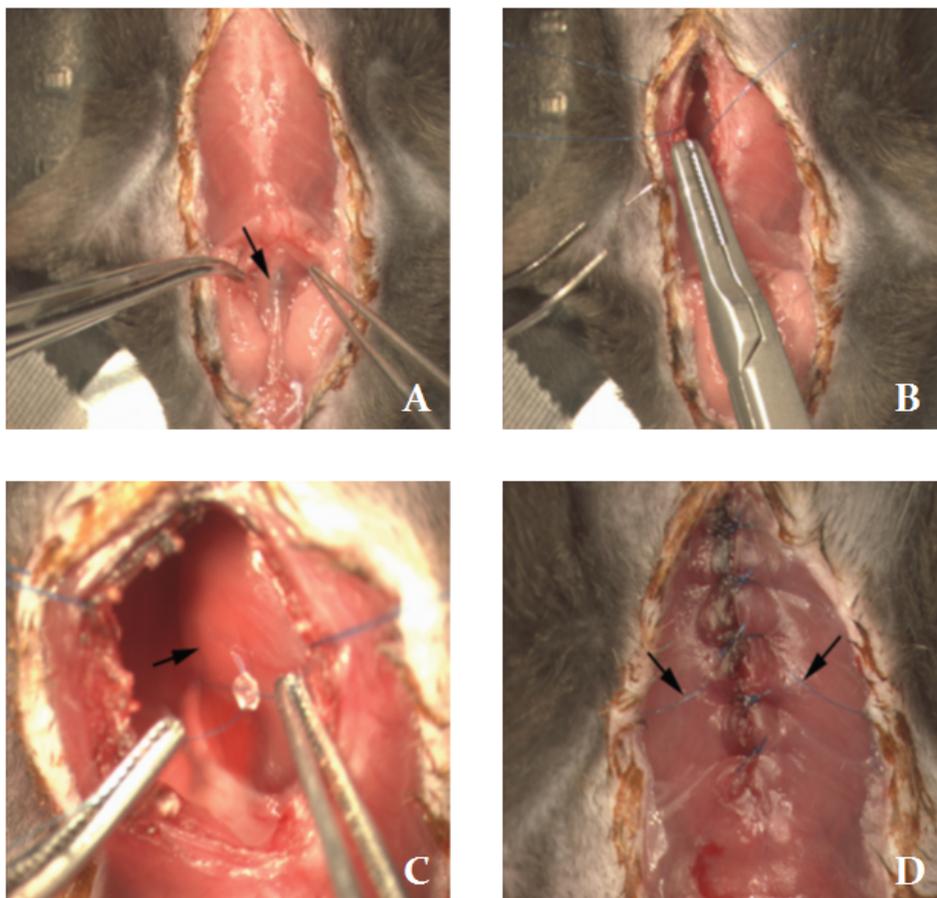


Abb. 3: Verlauf der Initialoperation, Implantation der LAD-Ligatur

(A) Dargestellte Trachea mit eingeführtem PE-10-Tubus (Pfeil: Vergrößerung X10), Intubation unter Sicht; (B) Offenhalten des Thorax nach Thorakotomie durch 6-0-Prolene[®]-Nähte (Vergrößerung x 10); (C) Fadenenden der 8-0-Prolene[®]-Nähte eingefädelt durch einen PE-10-Tubus nach Implantation der Ligatur um den LAD, Pfeil zeigt auf LAD (Vergrößerung x 30); (D) transthorakal ausgeführte Fadenenden der Ligatur bei geschlossenem Thorax und Lagerung der LAD-Schlinge in subkutanen Hauttaschen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Martin Zörlein).

3.5 Ischämie- und Reperusionsprotokoll

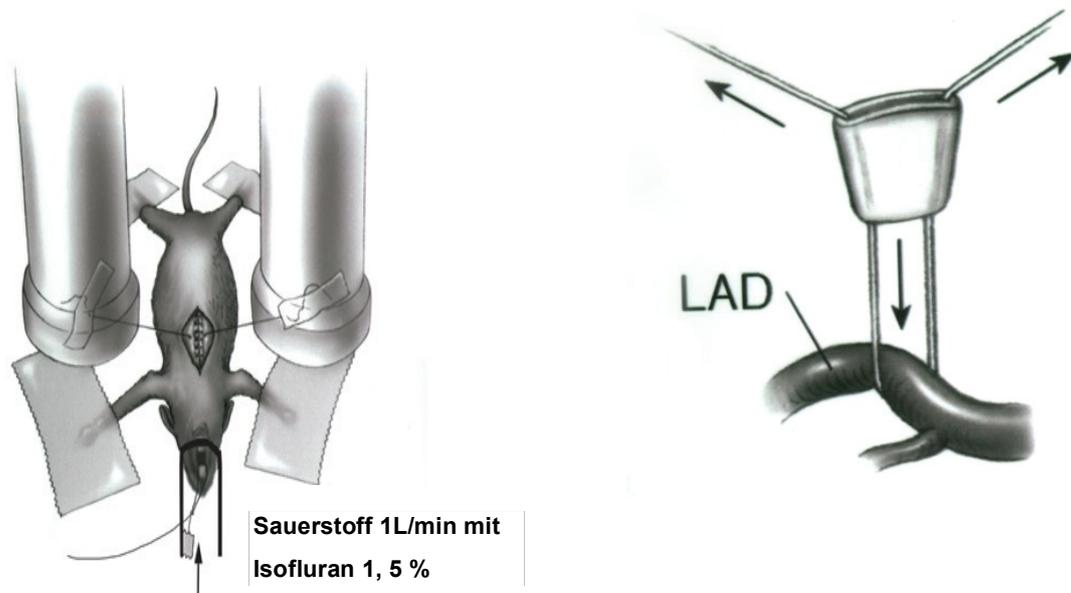


Abb. 4: Skizzierte Darstellung des Versuchsaufbaus der täglichen I/R

Modifiziertes Modell nach Nossuli et al. (Nossuli et al., American Journal of Physiology, 2001). Spontanatmende Maus, die ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch einatmet und auf dem Rücken liegend mit den Extremitäten an den EKG-Elektroden fixiert ist. Die LAD-Ligatur wird mit den beiden dargestellten Fadeneenden an den Metallzylindern fixiert und durch Auseinanderziehen eine Ischämie induziert. I/R = Ischämie und Reperfusion; LAD = „left anterior descending coronary artery“.

Nach der Initialoperation wurden die Mäuse einer 7-tägigen Erholungsphase vor der ersten I/R-Episode unterzogen. Dabei bestand das Protokoll der repetitiven kurzen I/R aus täglichen, 15-minütigen Ischämie-Episoden und anschließender Reperfusion bis zum nächsten Tag über 3 oder 7 konsekutive Tage. Echokardiographische Untersuchungen wurden an den 7-Tage-Mäusen vorgenommen. Die Narkose wurde bei den initialoperierten Mäusen mit einer 1,5 %igen Isofluranbeimischung (Forene, Abbott) bei Spontanatmung und einem Sauerstofffluss von einem Liter pro Minute über eine Nasenmaske durchgeführt. Die Extremitäten der Mäuse wurden am Operationstisch in Rückenlage fixiert und mithilfe von Klebestreifen und einer EKG-Ableitungscreme (SignaElectrode Cream, Parker Laboratories, NJ, USA) an den Ableitungselektroden befestigt, um ein EKG über die Ableitung II nach Einthoven aufzeichnen zu können (Abb. 4). Die über der dritten und vierten Rippe liegende Hautnaht wurde entfernt und die Haut erneut wenige

Millimeter eröffnet, um die darunterliegenden Fadenenden der LAD-Ligatur aus den subkutanen Taschen freizulegen. Die Fadenenden wurden an zwei Metallzylindern befestigt und durch vorsichtiges Auseinanderschieben der Zylinder gespannt, bis eine ST-Streckenhebung als charakteristisches Ischämiezeichen im EKG auftrat. Die Ligatur wurde demnach zugezogen und der LAD okkludiert. Die somit induzierte Myokardischämie wurde anschließend 15 Minuten aufrechterhalten. Daraufhin wurde die Ligatur vollständig entfernt, um eine Reperfusion des LAD herbeizuführen. Die erfolgreiche Reperfusion bestätigte sich in der Normalisierung der ST-Strecke im EKG. Die Fadenenden wurden bis zur nächsten I/R-Episode wieder in den Hauttaschen verstaut. Die Wunde wurde mit Cefalozin lokal behandelt und die Hautnaht erneut in oben genannter Technik verschlossen. Als Kontrolle einer erfolgreichen I/R diente das EKG, das vor, während und nach der Ischämie aufgezeichnet wurde (Abb. 5 A-E). Das Versuchsprotokoll wurde wie beschrieben gleichermaßen an WT-Mäusen als auch an MHC-PPAR- α -Mäusen durchgeführt. Alle Tiere, bei denen es nach Lösen der LAD-Ligatur nicht zu einer Normalisierung der ST-Strecke kam, wurden wegen Verdachts auf Myokardinfarkt aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen.



Abb. 5: EKG-Aufzeichnung (Ableitung II) zur Kontrolle der täglichen Ischämie und Reperfusion

(A) Normales EKG vor der Induktion einer Myokardischämie; (B) ST-Streckenhebung als charakteristisches Zeichen der frühen Phase der Ischämie und (C) späte Phase der Ischämie; (D) Normalisierung des EKGs nach erfolgreicher Reperfusion. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Martin Zörlein)

3.6 Entnahme der Mäuseherzen

Am Ende des Versuchsprotokolls erhielten die Mäuse nach 5-stündiger Reperfusion intraperitoneal eine letale Dosis (120 µg/g Körpergewicht) Natrium-Pentobarbital (Abbott Laboratories). Die Tiere wurden an den Extremitäten auf dem Operationstisch fixiert und außerdem eine Reklination des Kopfes herbeigeführt. Die Haut wurde durch einen V-förmigen Hautschnitt eröffnet, der vom Manubrium sterni beidseits bis kurz unter den Rippenbogen geführt wurde. Anschließend erfolgte die Thorakotomie durch einen U-förmigen Rippenschnitt von medioklavikular auf Höhe der sechsten Rippe rechts über das proximale Manubrium sterni und endete auf Höhe des sechsten Rippenbogens der kontralateralen Seite medioklavikular. Nach stumpfer Entfernung der Perikardreste und Abtrennung der großen Gefäße des Mäuseherzens konnte das noch kontraktile Herz exzidiert und in einer 4° C kalten kardioplegischen Lösung ausgewaschen werden.

Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung:

Die folgenden Ingredienzien wurden in einem Liter NaCl (Baxter, Deerfield, IL, USA) gemischt.

4 g NaCl (EM Science, St. Louis, MO, USA)

3,73 g KCl (EM Science)

1 g NaHCO₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA)

2 g Glukose (Sigma)

3 g 2,3-Butandion Monoxim (Sigma)

3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure (Sigma)

0,2 mg Nifedipin (Sigma)

10 ml Heparin (1000 I.E./ml; American Pharmaceutical Partners, Los Angeles, CA, USA)

Die Mäuseherzen, die für die molekularbiologischen Untersuchungen vorgesehen waren, wurden unmittelbar nach Entfernung von Perikard, der großen Gefäße und der bei-

de Vorhöfe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung der Ventrikel bei minus 80 Grad kalten Temperaturen im Kühlschranks aufbewahrt.

3.7 Echokardiographische Messung der ventrikulären Pumpfunktion

Fünf Stunden nach der letzten ischämischen Phase des Ischämie- und Reperfusionprotokolls erfolgte eine transthorakale echokardiographische Messung der Mäuse mittels 15MHz-Schallkopf (HDI-5000, ALT-Phillips, Oceanside, CA, USA). Es wurden sowohl systolische als auch diastolische Durchmesser des linken Ventrikels und der Vorderwand mit Hilfe von drei M-Mode-Aufnahmen gemessen, sodass die Fraktionsverkürzung (FS, „fractional shortening“) und Vorderwandverdickung (AWT, „anterior wall thickening“) berechnet werden konnten. Die Fraktionsverkürzung reflektiert die globale linksventrikuläre Pumpfunktion und wird aus den Ventrikel-Durchmessern während der Diastole (VW_{diast}) und während der Systole (VW_{syst}) bestimmt.

$$FS (\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

Die AWT (Vorderwandverdickung) beschreibt die regionale anteriore Pumpfunktion des linken Ventrikels und wird wie folgt bestimmt.

$$AWT(\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

Zudem wurde der enddiastolische Durchmesser (LVEDD) gemessen.

3.8 Histologische Methoden

3.8.1 Methode zur histologischen Fixierung

Die Herzen, die für die histologische Untersuchung vorgesehen waren, wurden nach Reinigung in der kardioplegischen Lösung und zwischenzeitlich kühlen Lagerung im Kühlschrank möglichst rasch nach Gewebeentnahme in einer Zink-Formalin-Lösung (Z-fix, Anatech, Battle, Creek, MI, USA) fixiert. Die Herzen wurden 18–22 Stunden in Z-fix gelagert, bestehend aus Formaldehyd (HCOOH), ionisiertem Zink und einer Pufferlösung. Anschließend wurden sie bis zur Paraffineinbettung in 70 %igem Ethanol eingelegt.

Um eine dauerhafte Fixierung zu erreichen, wurden die Herzen nach vollständiger Dehydrierung in einer Alkoholreihe mit 50 %-, 60 %- und 70 %igem Ethanol und einem 24-stündigem Bad in 70 %igem Ethanol in wasserabweisendes Paraffin gebettet. Die Einbettung erfolgte mittels Gewebeeinbettautomaten (Citadel 1000 Tissue Processor, Thermo-Shandon, Waltham, MA, USA) automatisch gemäß folgendem Prozessablauf, um die Herzen von Rückständen der Fixierungsflüssigkeit zu säubern:

40 min in einem 70 %igem EtOH (Harleco),

3 x 40 min in 95 %igem EtOH,

2 x 40 min in 100 %igem EtOH.

Danach wurden die Herzen in absteigender zeitlicher Reihenfolge jeweils 15, 10 und 5 Minuten in Xylol (Xylene, EDM, Darmstadt, Deutschland) gewaschen, um eine vollständige Entwässerung des Gewebes zu erzielen und den Alkohol zu entfernen.

Mittels Paraffineinbettung (Microm Embedding Center AP 280-2, Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA) wurden die Herzen in die erwünschte Position ausgerichtet, mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus, VWR, West Chester, PA, USA) infiltriert und schließlich ruhen gelassen, bis das Paraffin erhärtet war.

Anschließend wurden die entstandenen Paraffinblöcke mit dem Schlittenmikrotom (HM 310, Richard Allen) in 10 µm dünne Scheiben, ausgehend von der Herzbasis bis zur

Apex cordis geschnitten. Hierbei wurden alle 250 µm jeweils zehn 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mittels Pinsels in ein 42 ° C warmes Wasserbad übertragen, so dass sich die wohlmöglich durch die Mechanik der Schnitfführung entstehenden Falten im Paraffinschnitt wieder glätten ließen. Zum Schluss wurden die Herzschnitte vorsichtig auf einen Objektträger übertragen und an Luft eine Stunde getrocknet.

3.8.2 Auswahl der Präparate am H.E.-Schnitt

Um eine Übersicht über die Ausdehnung der ischämischen Areale im Herzen zu erhalten, wurde jeweils der erste Schnitt aus jedem 250-µm-Abschnitt ausgewählt und mit Hämatoxilin-Eosin (HE, VWR, Darmstadt, Deutschland) angefärbt, um diesen unter dem Mikroskop (Olympus, Modell BX41, Hamburg, Deutschland) zu untersuchen. Die geeigneten Schnitte, die für nachfolgende Färbungen dienen sollten, wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt:

Morphologie und Qualität des Schnittes: gut

Weite Entfernung des Schnittes zur Ligaturstelle

Morphologie des Schnittes: gut

Schnitt in der Ebene der Papillarmuskel-Insertion in die linksventrikuläre, um eine Vergleichbarkeit der für weitere Untersuchungen ausgewählten Schnitte aller Versuchstiere zu gewährleisten (Zitat Dewald, PNAS, 2003).

3.8.3 Allgemeines Vorgehen bei histologischen Färbungen

Um das Gewebe für die hydrophilen Reagenzien der histologischen Färbung aufnahmebereit zu machen, musste vor jedem eigentlichen Färbeprotokoll eine Deparaffinisierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte stattfinden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

3 x 5 min in Xylol

3 x 15 Dips in 100 %igem Ethanol

3 x 15 Dips in 95 %igem Ethanol

2 x 15 Dips in 75 %igem Ethanol

1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O

5 min in DEPC-ddH₂O waschen

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate erneut dehydriert und schließlich gegengefärbt.

1 x 15 Dips in 95 % igem Ethanol

1 x 2 Dips in Eosin (Eosin Y, Harleco)

(Ausnahme: Sirius-Rot-Färbung: siehe 3.8.5.)

1 x 15 Dips in 95 %igem Ethanol

1 x 15 Dips in 100 %igem Ethanol

3 x 15 Dips in Xylol

(„Dip“ bezeichnet das einmalige rasche Eintauchen in die entsprechende Lösung.)

Abschließend wurden die Präparate für 24 Stunden luftgetrocknet, nachdem sie nach beendeter Dehydrierung mit einem Deckblättchen (Micro cover glasses, VWR) und einem entsprechenden Kleber (Cytoseal 60, Richard Allen Scientific) fixiert wurden.

3.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Standardfärbung ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eine gebräuchliche histologische Methode, um Zellkerne dunkel (Hämatoxylin; blau-schwarz) und das restliche Gewebe rosa (Eosin) zu färben. Es wurde nach dem Färbeprotokoll von Carson, der sogenannten regressiven Methode, vorgegangen (Carson, 1996).

3 x 3 min Xylol

2 x 15 Dips in 100 %igem Ethanol

2 x 15 Dips in 95 %igem Ethanol

1 x 15 Dips in 75 %igem Ethanol

1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O

1 x 3 min in HE (Hämatoxin Stain, Stat Lab, Lewisville, TX, USA)

1 x 1 Dip in ein Salzsäure-Ethanol-Gemisch (70 %iger Ethanol mit 1 %iger Salzsäure: HCl, Lab Chem, Pittsburgh, PA, USA)

1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O

1 x 15 Dips in 1 %igem Ammoniumhydroxid in H₂O (NaH₄OH; J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

1 x 15 Dips in DEPC-ddH₂O

1 x 15 Dips in 95 %igem Ethanol

3 x 15 Dips in 100 %igem Ethanol

3 x 15 Dips in Xylol

3.8.5 Sirius-Rot-Färbung, Kollagenfärbung

Die Sirius-Rot-Färbung ist eine Methode zur Färbung des Kollagens.

Vor Gebrauch wurde die 0,1 %ige Sirius-Rot-Lösung aus 0,2 g Direct Red (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) und 200 ml gesättigter Pikrinsäure (Picrid Acid, EM Science) hergestellt und 10 Minuten stehen gelassen. Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Präparate 5 Minuten in einer Sirius-Rot-Lösung belassen und anschließend ohne Gegenfärbung wie folgt dehydriert und danach in xylollösliches Eindeckmittel gebettet:

15 x di-H₂O (destilliertes Wasser)

15 x 70 %iger Ethanol

15 x 100 %iger Ethanol

15 x 3 x Xylol

3.8.6 PAS-Färbung zum Anfärben von Glykogen

Zum Anfärben der Polysaccharide und Glykogen wurden die Kryoschnitte zunächst luftgetrocknet und dann 10 Minuten in 95 %igem Ethanol fixiert, bevor sie in Aqua Bidest gestellt wurden. Die Paraffinschnitte wurde wie oben beschrieben in einer absteigenden Alkoholreihe bis hin zum Aqua Bidest entparaffiniert. Glykogen wurde mit periodic-acid-Schiff-(PAS-)Reagenz nach Protokoll angefärbt. Die Spezifität der Glykogen-Färbung wurde durch eine Vorbehandlung mit α -Amylase verstärkt.

Als Negativ-Kontrolle wurde α -Amylase aus Speichel gewonnen und 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert und anschließend mit Aqua Bidest gespült.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. 5 min 0,8 % Perjidsäure zur Oxidation der Glykolgruppen zu di-Aldehydgruppen
2. 3 x 15 Dips Aqua Bidest
3. 10 min Schiffs Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure, die die di-Aldehydgruppen rosa bis violett färbt)
4. Spülen in heißem Leitungswasser zum Auswaschen des Schiffsreagenz, welches zum Farbumschlag führt
5. 15 Dips in Aqua Bidest
6. 5 min lauwarmes fließendes Leitungswasser
7. 15 Dips in Aqua Bidest
8. aufsteigende Alkoholreihe wie bei HE-Färbung

9. 3 x 2 min Xylol
10. Eindecken mit xylolhaltigem Eindeckmittel.

3.9 Immunhistochemische Methoden

3.9.1 α SMAC Färbung der glatten Muskelzellen

α -smooth muscle actin (α -SMAC) stellt eine in glatten Muskelzellen exprimierte Aktin-Isoform dar, die u. a. in der Tunica media von größeren, muskularisierten Gefäßen (Arterien und Arteriolen) vorherrschend ist (Skalli et al., 1986). Außerdem lassen sich dadurch Myofibroblasten anfärben, die eine entscheidende Rolle bei der reaktiven Kollagenbildung im ischämischen Myokard spielen. Diese wurden immunhistochemisch wie folgt farblich markiert:

1. Deparaffinieren und Rehydrieren:
3 x 7 min Xylol
2 x 5 min 100 % Ethanol
2 x 5 min 95 % Ethanol
2x 5 min 75 % Ethanol
2. Auswaschen für 5 min in Aqua Bidest.
3. Umranden der Gewebeareale mit Diamantstift und anschließender Inkubation 10 min in 3 % Wasserstoffperoxid („H₂O₂-Block“)
4. Auswaschen der Präparate 2 x 5 min in PBS (Phosphat-gepufferte NaCL-Lösung, pH 7,10)
5. 60 min Inkubation mit Maus IgG-Block (M.O.M.-kit: 2 Tropfen IgG-Block-Lösung auf 2,5 ml PBS)
6. Auswaschen der Präparate 2x 5 min in PBS

7. 5 min Inkubation mit M.O.M-Protein-Verdünnungslösung = M.O.M.-Lsg. (40 ml Proteinkonzentrat in 6 ml PBS)
8. Verdünnen der SM-Aktin-Antikörper (Ak, Sigma, Clone 1A4) 1:250
9. Ausklopfen der Präparate und 30 min Inkubation mit SM-Aktin-AK 1:250
10. Auswaschen der Präparate 2 x 5 min in PBS
11. 10 min Inkubation mit Biotin-IgG (1:250)
12. Auswaschen der Präparate 2x 5 min in PBS
13. Inkubation mit ABC-Peroxidas-Lösung (2 Tropfen A + 2,5 ml PBS + 2 Tropfen B)
14. Auswaschen der Präparate 2x 5 min in PBS
15. DAB-Färbung: (5 ml Aqua Bidest auf 2 Tropfen Puffer Stock-Lösung) + 4 Tropfen DAB-Lösung, 2 Tropfen H₂O₂-Lösung und 2 Tropfen Nickel-Lösung
16. Eosin-Gegenfärbung:
 - a. 2 x Eosin
 - b. 2 x Aqua Bidest
 - c. 15 x 70 % Ethanol
 - d. 15 x 95 % Ethanol
 - e. 15 x 100 % Ethanol
 - f. 3 x 3 min Xylol
17. Eindeckeln mit Xylol-löslichem Eindeckmittel Entellan.

3.9.2 Mac-2-Färbung zur Detektierung von Makrophagen

Mac-2 ist ein Kohlenhydrat-bindendes Protein und hat eine atomare Masse von 32 kDa. Als Antigen wird es hauptsächlich auf der Oberfläche von inflammatorischen Makrophagen exprimiert (Ho & Springer, 1982). So konnte Mac-2 auf Gewebsmakrophagen und auf epithelialen Zellen nachgewiesen werden (Flotte et al., 1983).

Deparaffinisierung und Rehydrierung

3 x 7 min in Xylol

3 x 5 min in 100 %igem Isopropanol

2 x 5 min in 90 %igem Isopropanol

1 x 5 min in 70 %igem Isopropanol

1 x 5 min in DEPC-ddH₂O

Gewebe mit Paraffin-Stift (ImmunEdges Pen; Vector) umranden und 25 bis 30 min in 3 %igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂; Sigma) inkubieren

2 x 5 min mit „Dulbeccos-Phosphat-Buffered-Saline“, pH 7,4 (dPBS; Bio WITTHAKER, Walkersville, MD, USA) auswaschen

Inkubation für 2 x 15 min mit IgG-Block (250 µl Rabbit-Stock-Solution in 5 ml PBS)

IgG-Block von den Präparaten abschütteln und 120 min oder über Nacht bei 4 °C mit den M3/38-Antikörpern inkubieren (Verhältnis: 1: 500 = 4 µl in 2 ml IgG-Block-Lösung)

2 x 2 min mit dPBS auswaschen

Inkubation für 30 min mit Biotin-IgG (12 µl in 2,5 ml IgG-Block-Lösung)

2 x 2 min mit dPBS auswaschen

Inkubation für 30 min mit ABC-Peroxidase-Lösung (jeweils 100 µl von der Kit-Lösung A und B auf 5 ml dPBS; muss mindestens 30 min vorher vorbereitet werden)

2 x 2 min mit dem dPBS auswaschen

Diaminobenzol-Färbung (DAB) aus 5 ml DEPC-ddH₂O und 100 µl Puffer anfertigen und innerhalb von 10 min verwenden. Die Stammlösung wird aus 200 µl DAB-Lösung sowie 100 µl H₂O₂ und 100 µl Nickel-Lösung (Vector) hergestellt.

Die Färbung erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle, bis sich die Positivkontrolle schwarz angefärbt hat.

Die Färbung wird durch 5-minütiges Waschen in DEPC-ddH₂O beendet.

Gegenfärbung mit Eosin und abschließende Dehydrierung.

3.10 Auswertung der histologischen Untersuchungen

Unter dem Mikroskop (Olympus, Modell BX41, Hamburg, Deutschland) wurden die erfolgreich angefärbten Präparate begutachtet und die für die Auswertung geeigneten Abschnitte (Papillarmuskelebene) mit einer Digitalkamera (Olympus, Modell DP70; Hamburg, Deutschland) computergesteuert fotografiert. Anschließend wurden die Fotos in einer Auflösung von 2600 x 2060 Pixel gespeichert (Software Axio Vision 3.1.2.1; Carl Zeiss). Abhängig von der Färbung wurde eine 10-fache (Plan-Neofluar-Objektiv, 10 x/0,3; Carl Zeiss), 20-fache (Plan-Apochromat-Objektiv, 20 x/0,6; Carl Zeiss) oder 40-fache (Plan-Neofluar-Objektiv, 40 x/0,85; Carl Zeiss) Vergrößerung verwendet und Bilder vom ischämischen Bereich als auch vom in der Regel nicht ischämischen Septumgewebe (als interne Kontrolle dienend) wurden in dieser Vorgehensweise aufgenommen und gespeichert.

3.10.1 Planimetrische Kollagenauswertung

Die quantitative Auswertung des myokardialen Kollagengehaltes der Sirius-Rotgefärbten Präparate konnte mithilfe der computergesteuerten Programme Adobe Photoshop (4.0, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) sowie „Cell“ (Cell F, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) und Makro Prisca vorgenommen werden. Die Präparate wurden mit einer Belichtungszeit von 2 ms und einer Beleuchtung des Mikroskops von 3–3,5 unter dem Mikroskop (Olympus) bei 100-facher-Vergrößerung fotografiert (Olympus). So entstand je ein Foto pro Vorderwand, Seitenwand, Hinterwand und Septum der Sirius-Rot-gefärbten Mäuse-Herzen. Die Bilder wurden nach einem Weißabgleich in der Datenbank mit einer Höhe von 2699 Pixeln, einer Breite von 3380 Pixeln

und einer Auflösung von 300 Pixel/Zoll gespeichert. Es folgte die HSI-Anpassung der in „Cell“ geöffneten Bilder. Hier wurde eine Farbanpassung des entsprechenden Bildes vorgenommen, indem aussagekräftige Farbwerte, eine Sättigung und eine angemessene Intensität der Farbgebung des Fotos eingestellt wurden. Damit ließen sich die in der Sirius-Rot-Färbung charakteristisch prominenten roten Kollagenfasern deutlicher von den gelb angefärbten Myozyten unterscheiden. Das Perikard, die Gefäße und das Endokard wurden ausgeschnitten, um eine Verfälschung der erhobenen Daten bei der Kollagenauswertung zu vermeiden, da sich diese ebenfalls in der Sirius-Rot-Auswertung rot anfärben.

Die Analyse der erhobenen Messwerte erfolgte computergesteuert durch manuelle Markierung der zusammenhängenden Fläche des Myokards. Das Kollagen wurde in gleicher Vorgehensweise ausgewählt und die analysierten Daten wurden schriftlich festgehalten. Die Fläche der markierten Bereiche des Kollagens dividiert durch die Gesamtfläche ergab den prozentualen Anteil des angefärbten Kollagens.

3.10.2 Zellzählung der Mac-2 positiven Makrophagen

Die Objektträger mit der Mac-2 Antigen-Färbung wurden mit 400-facher Vergrößerung fotografiert. Zunächst wurde die notwendige Kalibrierung (10 x; 20 x; 40 x mal der eingestellten Pixelzahl 2600 x 2060) mittels ImageProPlus (Media, Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA) eingestellt. Anschließend wurde das Myokard umrandet und somit die entsprechende Fläche in μm^2 ermittelt. Die in diesem Areal gut erkennbaren Makrophagen wurden einzeln per Mausklick markiert. Auf diese Weise konnten die schwarz gefärbten Makrophagen ausgezählt werden.

In Microsoft Excel 2002 (Microsoft, Redmond, CA, USA) wurden die ermittelten Daten gespeichert und als Mittelwert der positiven Zellen pro mm^2 aus dem Infarktbereich und dem internen Kontrollgewebe des nicht-ischämischen Septums errechnet.

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 mRNA-Isolation aus Mäuseherzen

Das folgende Protokoll basiert auf der von Chomczynski et al. (1987, 2006) entwickelten Technik zur Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Gewebeproben.

Die schockgefrorenen Herzen wurden in 2 ml kühlschrankkalter RNA-STAT-60-Lösung (Tel-Test, INC., Friendswood, TX, USA) mittels Gewebehomogenisators (MICCRA D1, ART, Müllheim, Deutschland) zerkleinert. Vor und nach jeder neuen Probe wurde der Homogenisator mit RNase-away (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) gesäubert. Zudem wurde die Klinge des Homogenisators mechanisch mit einem scharfen Instrument von evtl. verbliebenen Proberesten gesäubert und schließlich in 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma-Aldrich) und in Diethylpyrocarbonat-behandeltem doppelt deionisiertem Wasser (DEPC-ddH₂O; Sigma) gereinigt.

Dann wurde das homogenisierte Gewebe in drei neue sterile 50 ml Falcon Tubes (Becton Dickinson) überführt und zur Phasentrennung 200 µl R-Chloroform (99 %iges R-Chloroform; Sigma-Aldrich) zu den Proben hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 g in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (Beckman-Coulter, Avanti J25, Rotor JA; Palo Alto, CA, USA) ließen sich drei Phasen erkennen: die proteinreiche feste Bodenschicht, eine weißliche Interphase, in der sich DNA- und Membranreste der Zellen befanden, und die obere Schicht, ein RNA-haltiger wässriger Überstand. Die obere, klare Phase wurde mithilfe einer 1000-µl-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und in das verbleibende, vorbeschriftete 15 ml Falcon Tube überführt. Der Rest, also Interphase und Unterphase, wurde verworfen.

Dem Überstand wurde zur Ausfällung 1 ml eiskaltes 99 %iges Isopropanol (-80 °C) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Danach wurde die Mischung zur Ausfällung für mindestens 2 Stunden in einen -20 °C kalten Kühlschrank (Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland) gegeben. Danach folgte die 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgossen, ohne das entstandene Pellet mit herauszuspülen. Zum Waschen der Probe

wurden 2 ml eiskaltes, 75 %iges Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (ETOH) (VWR International GmbH) verwendet. Nach erneutem Vortexen (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) folgte eine erneute 15-minütige Zentrifugation. Dieser Schritt diente dazu, die letzte Spuren von TRIzol auszuwaschen (Chomczynski und Sacchi, 2006). Der Überstand wurde erneut verworfen und die Tubes wurden schräg, mit der Öffnung nach unten, zum Trocknen positioniert. Nach 10 Minuten entfernten wir mit einem sterilen Q-Tip die noch übrigen großen Tropfen.

Das getrocknete RNA-Pellet wurde mit 200 μl DEPC-ddH₂O (Applied Biosystems) durch mehrmaliges Auf-und-ab-Pipettieren resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gelegt und nochmals resuspendiert. Ein kurzer „Quick-Spin“ sollte sicherstellen, dass sich das gesamte Probenmaterial im unteren Teil des Tubes befand.

Die nun isolierte RNA wurde in einem letzten Schritt mit Hilfe des PureLink RNA Mini™-Kit (Invitrogen) von letzten Protein- und Ethanol-Resten befreit. Bestandteile des Kits waren:

RNA-Lysis-Solution (125 ml)

Wash Buffer I (50 ml)

Wash Buffer II (15 ml) -> (add 60 ml 100 % Ethanol)

RNase-freies Wasser (15 ml)

RNA-Spin-Cartridges mit Collection-Tubes (50 Stück)

RNA-Wash-Tubes (50 Stück)

RNA-Recovery-Tubes (50 Stück)

Alle Zentrifugationen wurden mit 12000 g bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei allen Zwischenschritten waren die Tubes auf Eis zu lagern. Zu Beginn wurden für jede Probe 2 RNA-Wash-Tubes und 1 RNA-Recovery-Tube mit der Nummer der Maus versehen und in ein Rack einsortiert. Für jede Aufreinigung musste die RNA-Lysis-Solution frisch mit 1 % 2-Mercaptoethanol (Invitrogen) versehen werden. Von der frisch zubereiteten Mischung wurde 200 μl jeder Probe (200 μl Menge) sowie 200 μl 100 %iges Ethanol hinzugegeben. Die Mischung wurde gevortext und anschließend komplett mit einer 1000

µl Pipette in eine RNA-Spin-Cartridge überführt. Diese wurde dann 15 Sekunden zentrifugiert, das Eluat verworfen und die Spin-Cartridge erneut in das gleiche Tube eingeführt. Die RNA hatte sich nun in der Silicamembran der Spin-Cartridge festgesetzt und konnte aufgereinigt werden. Hierzu wurden mittels 1000-µl-Pipette 700 µl der Wash-Buffer I in die Spin-Cartridge pipettiert und wieder für 15 Sekunden zentrifugiert. Schließlich wurden der Eluat und das Wash-Tube verworfen und die Spin-Cartridge in ein frisches Wash-Tube eingesetzt. Nun wurden 500 µl des Wash-Buffer II in die Spin-Cartridge pipettiert und wieder zentrifugiert. Nach Verwurf des Flow-Through wurde dieser Schritt wiederholt und nun nach erneutem Verwurf des Eluats wurde die Spin-Cartridge für 3 Minuten zentrifugiert. Der Wash-Tube konnte anschließend verworfen und die Spin-Cartridge in den Collection-Tube eingesetzt werden. Zum Eluieren der RNA wurden 58 µl Ribonuklease (RNase)-freies Wasser auf die Spin-Cartridge aufgetragen. Dieses wurde für 2 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser wiederholt. Das Auswaschen der RNA wurde auf zwei Schritte verteilt, um eine höhere Konzentration an RNA zu erzielen. Die so gesammelte, aufgereinigte RNA konnte nun zu je 25 µl in kleine 200 µl PCR Tubes (Molecular BioProducts) pipettiert und bei -80°C gelagert werden.

Der im Tube verbliebene Rest konnte zur Konzentrationsbestimmung spectrophotometrisch mithilfe des NanoDrop (NanoDrop Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen werden. Hierbei wurde auch die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt, um daraus einen Quotienten zu bilden. Der verwendete Quotient ist ein Maß der Verunreinigung der Probe mit DNA und sollte möglichst über 1,9 liegen (Chomczynski und Sacchi, 2006).

3.11.2 Synthese der cRNA-Sonde aus isolierten mRNA-Proben mittels reverser Transkription

Um die mRNA in Antisense-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben, verwendeten wir das High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Es wurde der Probe von 25 µl eine gleich große Menge von frisch zubereitetem „Master Mix“ hinzugegeben. Dieser „Master Mix“ stellte sich aus den folgenden Reagenzien zusammen:

Reagenzien	Volumen (µl) pro Reaktion
Nuklease-freies Wasser	8
10x reverse Transkriptase-Puffer	5
10x random Primer	5
25x dNTPs	2
RNase Inhibitor	2,5
Multi Scribe reverse Transkriptase (50 U/µl)	2,5
Insgesamt	25

Tab. 1: Zusammensetzung des „Master Mix“ für die Umschreibung der cDNA

Die Reagenzien wurden in der o.g. Reihenfolge zusammengemischt, sodass insgesamt 25 µl des „Master Mix“ einer jeden Probe zur Umschreibung der mRNA in cDNA hinzugegeben wurden.

Vor Zusammenmischen der Komponenten in oben aufgeführter Reihenfolge waren diese auf Eis aufzutauen und es war darauf zu achten, dass die Multi Scribe reverse Transkriptase erst kurz vor Gebrauch aus dem Kühlschrank genommen wurde. Außerdem musste ein Aufschlag von 10 % wegen Volumenverlusts eingerechnet werden. Nachdem alle Komponenten zusammenpipettiert waren, wurde kurz gevortext.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden zu jeder Probe 25 µl „Master Mix“ gegeben und durch kurzes Auf-und-ab-Pipettieren gemischt. Nachdem alle Proben gemischt waren, wurde nochmals gevortext und kurz zentrifugiert.

Nach Beladen des Thermo Cycler (UNO-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde dieser wie folgt programmiert:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 sec	bis Ende

Tab. 2: Temperaturzyklus für die cDNA-Synthese

In Schritt 1 erfolgt das Annealing, also das Anlagern der Primer an die mRNA, in Schritt 2 erfolgt die eigentliche reverse Transkription mit Synthese der cDNA, in Schritt 3 wird die reverse Transkriptase deaktiviert und Schritt 4 dient der Lagerung bis zur Entnahme der Proben.

Nachdem das Programm beendet war, wurden die Proben entnommen und auf Eis gelagert. Es folgte die Verdünnung der Proben auf 2,5 ng/µl. Dieser Schritt war notwendig, um bei der später durchzuführenden quantitativen real-time-PCR (qRT-PCR) eine gleiche Konzentration für alle Proben herzustellen. Die anschließende Verdünnung wurde so angelegt, dass sich ein Gesamtvolumen von 500 µl pro Probe ergab. Dieses wurde auf 20 Aliquots zu je 25 µl aufgeteilt. Bis zur späteren Verarbeitung wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

3.11.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die RT-qPCR wurde von Mullis et al. (Mullis et al., 1990; 1987) beschrieben. Ein wesentlicher Vorteil der RT-qPCR ist, dass sie in der Lage ist, DNA im Vergleich zu früheren Methoden kostengünstig zu vervielfältigen (Powledge, 2004).

Die wesentlichen Dinge, die für eine PCR gebraucht werden, sind ein zu vervielfältigendes DNA-Segment (Template), die dazu komplementären Primer zum Start der Replikation, Nukleotide als Bausteine und die Polymerase, um die Nukleotide in der komplementären Folge zum Template zusammenzubauen. (Powledge, 2004).

Die PCR läuft in 3 sich wiederholenden Schritten ab:

1. **Denaturierung:** Durch eine Erhitzung auf 90–96 °C trennen sich die zum Doppelstrang gepaarten DNA-Moleküle und werden somit frei zur Anlagerung der Primer.
2. **Hybridisierung/Annealing:** Bei 30–65 °C binden die Primer an ihre komplementären Anteile der DNA. Je genauer die Primersequenz auf die DNA passt, desto fester ist die Bindung.
3. **DNA-Synthese:** Bei 65–75 °C liegt das Optimum der Aktivität der Taq-(*Thermus aquaticus*-)Polymerase. Die Erhöhung der Temperatur dient außerdem dazu, falsch gebundene Primer wieder zu lösen, und hilft somit nur, die Replikation der gewünschten Bereiche sicherzustellen (Powledge, 2004).

Mit der Entdeckung des in heißen Quellen lebenden und an dortige Bedingungen optimal angepassten Bakteriums Taq wurde die PCR revolutioniert. Es besitzt eine Polymerase, die ihr Aktivitätsoptimum bei 75 °C hat und bis zu Temperaturen von 93–95 °C stabil bleibt (Lawyer et al., 1989). Das bedeutet, dass Taq den Schritt der Denaturierung übersteht und somit nicht, wie früher, nach jedem Zyklus wieder neu hinzugegeben werden muss (Lawyer et al., 1989).

Mit der von Higuchi et al. entwickelten real-time PCR war es zum ersten Mal möglich, in Echtzeit die Vervielfältigung der DNA sichtbar zu machen (Higuchi et al., 1993). Das hier verwendete PCR-Protokoll entspricht dem der RT-qPCR, bei der nicht nur die Möglich-

keit besteht, in Echtzeit eine Replikation zu beobachten, sondern diese auch quantitativ zu messen.

3.11.4 Theoretischer Hintergrund

Alle Methoden basieren auf dem Verfahren der einfachen PCR, bei dem pro Zyklus die Kopien der Vorlage verdoppelt werden (Powledge, 2004). Allerdings geht die exponentielle Phase, in der es zur Verdopplung der zu kopierenden DNA-Abschnitte kommt in eine Plateau-Phase über. Dies liegt zum Ersten an der Erschöpfung der Nukleotid-Reserven und zum Zweiten am sogenannten self-annealing. Self-annealing beschreibt das Zusammenlagern der Primer an sich selbst. Außerdem könnte es zu einem Mangel an Polymerasen kommen (Kubista et al., 2006).

Um die Vervielfältigung messen zu können, bedient man sich fluoreszierender Marker, die aus 2 Bestandteilen bestehen, dem Reporter und dem Quencher. Der Reporter kann, wenn er durch einfallendes Licht angeregt wird, ein Signal einer Wellenlänge aussenden. Der Quencher ist so gewählt, dass er aus nächster Nähe das fluoreszierte Licht des Reporters absorbiert und somit ein Antwortsignal unterdrückt.

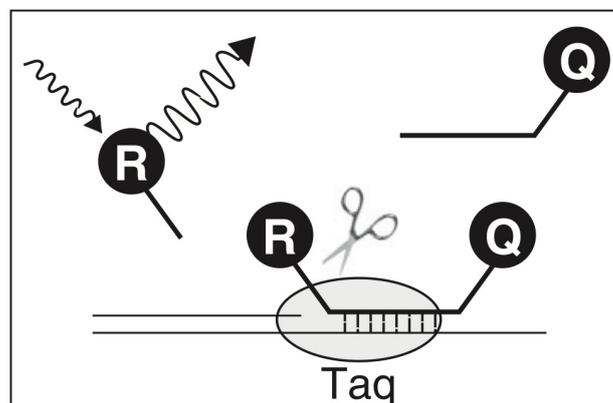


Abb. 6: Trennung von Reporter und Quencher durch Polymerase eines fluoreszierenden Markers

Abbildung von Valasek und Repa (Valasek und Repa, *Advances in Physiology Education*, 2005). Erst durch Trennung der Verbindung zwischen Reporter und Quencher kann das Signal des Reporters empfangen werden.

Beide Bestandteile lagern sich – zusammengefasst als Einheit – an das zu vervielfältigende Template an. Während der Replikation bricht die Polymerase die Verbindung zur DNA auf und spaltet Reporter von Quencher. Somit kommt es zu einem Signal, das umso stärker ist, je mehr Replikationen von der Polymerase durchgeführt wurden (Valasek und Repa, 2005). In dieser Arbeit wurde der Reporter „FAM“ mit dem Quencher „TAM-RA“ verwendet.

Bei der Detektion gibt es zwei nicht aussagekräftige Phasen. Zu Beginn der Zyklen ist das Signal noch nicht stark genug und es kann nicht vom „Hintergrundrauschen“ unterschieden werden. Hier geschieht die Replikation zwar exponentiell, ist jedoch nicht als solche zu messen. Die zweite Phase ist die Plateau-Phase (Kubista et al., 2006).

Um verwertbare Ergebnisse zu erlangen, ist es wichtig, die Phase der exponentiellen Replikation zu messen. Um dies zu verwirklichen, setzt man eine „Threshold line“. Dieser Schwellenwert ist eine definierte Signalstärke. Es wird nun gemessen, wie viele Zyklen notwendig sind, bis diese definierte Signalstärke erreicht wird. Dies ist dann das „CT value“ (engl. „Cycle Threshold“ für Schwellenwert-Zyklus), das den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Alle Template-Sets enthielten die cDNA von den „housekeeping genes“ Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein konstant induziertes Gen aus der Glykolyse, das stoffwechselunabhängig produziert wird, sodass eine interne Standardisierung der Quantität der mRNA-Expression gewährleistet war.

3.11.5 Durchführung der Taqman[®] RT-qPCR

Zu Beginn wurde die gesamte Arbeitsfläche mit vergälltem Alkohol und RNase-away (Molecular BioProducts) besprüht und mit Einmaltüchern trocken gewischt. Außer den zu messenden Proben wurde je Gen ein Tube mit „CAL“ als Kalibrator und eines mit „NTC“ (No Template Control) als Leerkontrolle vorbereitet. Der Kalibrator war eine Probe, die bei jeder RT-qPCR und mit jedem Gen mitlief, um eine Vergleichbarkeit und somit eine Qualitätssicherung in verschiedenen PCR-Läufen zu gewährleisten. Als Kalibrator (CAL) verwendeten wir cDNA von Maus Nr. 78, welche eine sehr hohe Menge an

RNA in der Isolation aufwies und welche daher für viele Versuche zur Verfügung steht. Die NTC galt dem Ausschluss einer Verunreinigung des verwendeten DEPC-ddH₂O sowie des Mastermixes.

Nun wurden die zu messenden Proben aus dem Kühlschrank genommen und auf Eis aufgetaut. Danach folgte kurzes Vortexen mit anschließendem Quick-Spin zur Durchmischung der Proben.

Um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, wurde jede Probe dreifach bestimmt. Deshalb wurde auch bei Zubereitung des „Master Mixes“ dieser verdreifacht. Es wurde jeder Probe (6,65 µl) jeweils 27 µl Master Mix zugegeben und diese durch Auf-und-ab-Pipettieren gemischt. Durch die Beschreibung dieser Durchführung wäre allerdings die Übersichtlichkeit verloren gegangen und die wesentlichen Schritte wären nicht klar hervorgehoben worden.

In das vorbereitete Tube wurde 6,65 µl der verdünnten Probe auf Eis vorgelegt. Das NTC-Tube wurde stattdessen mit 6,65 µl DEPC-ddH₂O befüllt. Der benötigte „Master Mix“ (Menge) wurde immer kurz vor der Messung frisch angesetzt. Er bestand aus DEPC-ddH₂O, TaqMan™ Gene Assay (Applied Biosystems) sowie TaqMan™ Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Master Mix für qRT-PCR	Menge pro Well		Zuschuss	
TaqMan™ Universal Master Mix	5 µl	x 3	+ 20 %	18 µl
TaqMan™ Gene Assay	0,5 µl			1,8 µl
DEPC-ddH ₂ O	2,5 µl			9 µl
Menge je Probe:				28,8 µl

Tab. 3: Zusammensetzung des Master Mix für die qRT-PCR

Die Menge je Well der 384-Well-Plate muss verdreifacht werden, da von uns Dreifachbestimmungen der Proben durchgeführt wurden. Außerdem gab es einen Zuschuss von 20 %, um in den Pipettierspritzen verbleibende Mengen zu kompensieren.

Mithilfe einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden nun die Proben auf der 384-Well-Plate verteilt und diese mit einer Cover-Plate-Abdeckfolie (Applera Deutschland GmbH) sorgfältig verschlossen. Vor Einbringen in das Real-Time-Cycler System 7900HT (Applied Biosystems) führten wir mit der 384-Well-Plate eine Zentrifugation mit 2000 rpm für 2 Minuten durch.

Zur Messungsaufzeichnung und Steuerung des Real-Time-Cyclers verwendeten wir die Gerätesoftware SDS 2.2 (Applied Biosystems).

3.11.6 Auswertung der Messergebnisse

Bei unseren Versuchen wurden die Zyklen gemessen, bei denen die Threshold von 0,1 durchbrochen wurde. Diese Zyklen wurden in Relation zu den Zyklen gesetzt, die GAPDH brauchte, um diese Threshold zu erreichen. Durchschnittlich waren dies 19 Zyklen bei GAPDH.

Zur Ergebnisauswertung haben wir dann je Gruppe und Gen den $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert (Differenz der beiden Schwellenwert-Zyklus-Werte, engl.: „Cycle-Threshold-Werte“) bestimmt und diese statistisch auf signifikante Unterschiede geprüft.

3.12 Statistische Auswertung

Die hier aufgeführten Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism (Version 5.0; Graphpad Inc., Jolla, CA, USA) erfolgte unter Verwendung des Newman-Keuls-Tests (einfaktorieller ANOVA-Test) die Varianzanalyse. Die statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen nur zwei Mäuse-Gruppen wurde mittels t-Tests für unverbundene Stichproben erhoben. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchstiere

Das repetitive kurze I/R-Protokoll wurde an männlichen und weiblichen MHC-PPAR- α überexprimierten Mäusen und an Wildtyp-C56/B16 (WT)-Mäusen mit einem Alter von 10-12 Wochen für 3 und 7 konsekutive Tage durchgeführt.

WT-Mäuse, die während ($n=18$, Überlebensrate = 70 %) oder nach ($n=5$, Überlebensrate = 91 %) der Initialoperation verstorben sind, und Mäuse die den I/R-Eingriff ($n=4$, Überlebensrate = 94 %) nicht überlebt haben, wurden aus der Studie ausgeschlossen. An 32 von insgesamt 59 Mäusen konnte erfolgreich das I/R-Protokoll durchgeführt werden, sodass sie den folgenden Gruppen zugeteilt wurden:

Nativgruppe (n = 8): keine Initialoperation.

Kontrollgruppen (n = 8): Initialoperation, aber keine I/R.

I/R-Gruppen (n = 16): Initialoperation und I/R-Protokoll. 16 Mäuse wurden zu jeweils $n = 8$ in die 3- und 7-Tage-Kontroll-Gruppe eingeteilt.

Außerdem wurden im Zuge der Arbeit 80 heterozygot gezüchtete transgene Tiere mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression von PPAR- α (MHC-PPAR- α) verwendet. Insgesamt konnten 33 Mäuse nicht zur folgenden Auswertung herangezogen werden. Mäuse, die während der Initialoperation oder des I/R-Eingriffes ($n=15$, Überlebensrate = 81 %) und nach Initialoperation direkt postoperativ oder im Käfig verstorben sind ($n=11$, Überlebensrate = 86 %), wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. An 7 Tieren konnte entweder die initial implantierte LAD-Ligatur nicht mehr aufgefunden werden, bzw. es war ein Ohrclip zur Markierung der Mäuse ausgerissen so dass diese ebenfalls nicht in nicht zur folgenden Auswertung herangezogen wurden. 47 MHC-PPAR- α Mäuse wurden in folgende Gruppen unterteilt:

Nativgruppe (n = 7): keine Initialoperation.

Kontrollgruppe (n = 12): 7d nach der Initialoperation, kein I/R-Protokoll.

I/R-Gruppen (n = 28): Initialoperation und I/R-Protokoll. Es wurden n = 7 Mäuse in die 3- und n = 9 Mäuse in die 7-Tage-Gruppen für die histologischen Untersuchungen sowie n = 6 Mäuse in die 3- und 7-Tage-Gruppen für die molekularbiologischen Untersuchungen eingeteilt.

4.2 Regulation von PPAR- α

Die Expression der PPAR- α mRNA war wie erwartet hoch in unseren MHC-PPAR- α -Mäusen und gering in der WT-Kontrollgruppe. Die Konzentration der PPAR- α mRNA nahm während des repetitiven I/R-Protokolls in MHC-PPAR- α Mäusen entsprechen der Ergebnisse von Dewald et al. (Dewald, PNAS, 2003) wieder ab (Abb. 7).

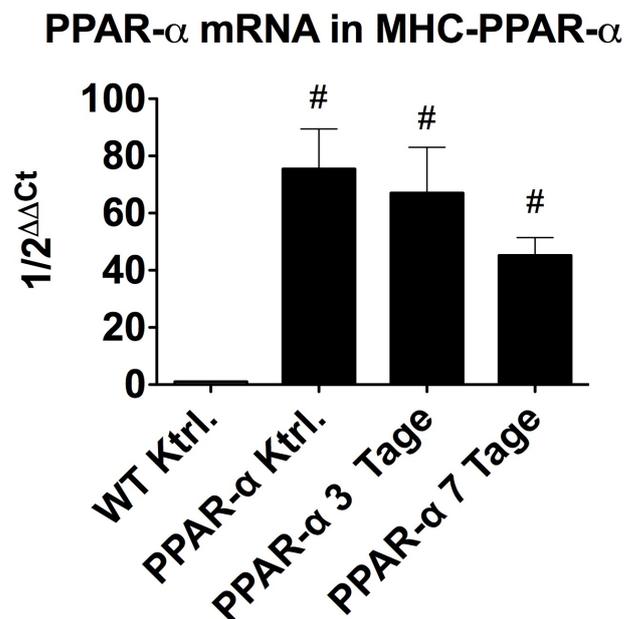


Abb. 7: Expression von PPAR- α mRNA in MHC-PPAR- α -Mäusen

Hohe Expressionswerte in den MHC-PPAR- α Mäusen, welche während repetitiver I/R abnehmen. In WT-Kontrolltieren kommt es zu nahezu keiner Induktion von PPAR- α . WT = Wildtyp, PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , RT-qPCR mit Taqman[®], mRNA-Expression in Relation zu GAPDH und auf Kontrollgruppe (Ktrl.) bezogen, unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, # p < 0,05 im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: n = 8/Gruppe; MHC-PPAR- α : n = 6/Gruppe.

4.3 Pathomorphologische Befunde

In den Herzen der Kontrollmäuse der WT- und der MHC-PPAR- α -Mäuse waren keine histomorphologischen Veränderungen im Vergleich zu den Nativmäusen zu beobachten.

Im H.E.-Präparat ließ sich zum einen die Ventrikelanatomie orientierend beurteilen und zum anderen der zeitliche Verlauf der Fibrosierung bzw. Heilung nach Induktion einer Ischämie und anschließender Reperfusion gut verfolgen (Abb. 8). Die im Zuge des ischämischen Gewebsuntergangs entstehende Koagulationsnekrose ließ verklumptes Chromatin am Zellrand als Zeichen der typischer Weise bei Nekrose auftretenden pyknotischen Zellkerne und unscharfe Zellgrenzen erkennen. Die Querstreifung der Kardiomyozyten war nur noch zum Teil erhalten.

In den H.E.-Färbungen der WT-Mäuse konnte nach 7 Tagen I/R eine interstitielle zelluläre Infiltration ohne Kardiomyozytenverlust nachgewiesen werden (Abb. 8 A). MHC-PPAR- α -Mäuse präsentierten zur gleichen Zeit einen Kardiomyozytenverlust in kleinen abgegrenzten Arealen mit hoher zellulärer Infiltration so genannten Mikroinfarkten, in der ischämischen linken Ventrikelwand (Abb. 8 B).

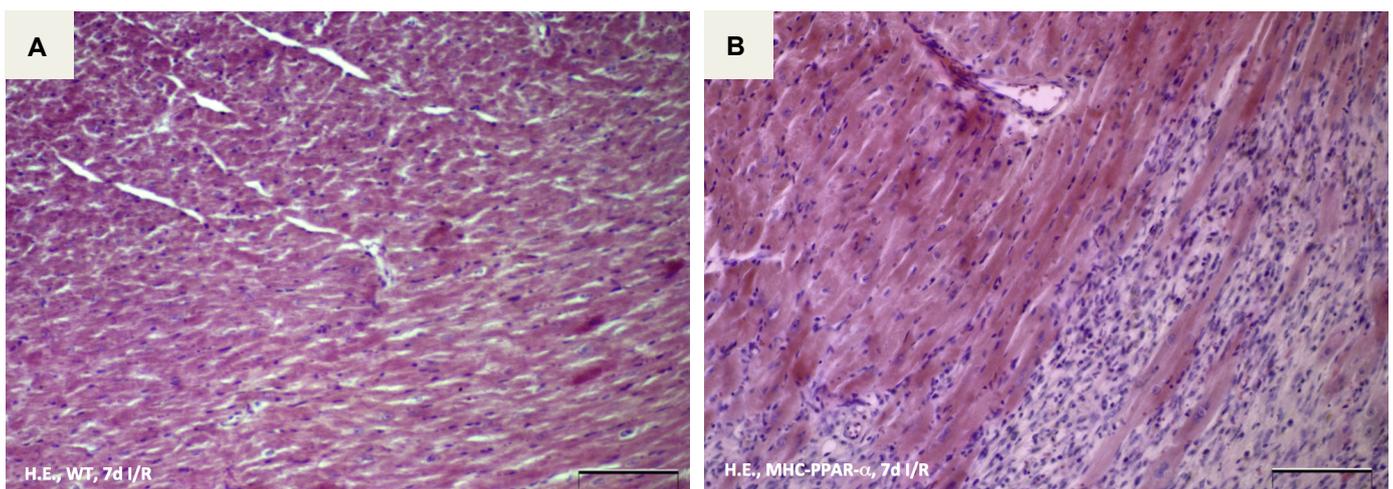


Abb. 8: Histologie des reperfundierten ischämischen Myokards bei WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen

(A) Interstitielle Ablagerung eines zellulären Infiltrats in WT-Herzen nach 7 Tagen I/R. (B) Kardiomyozytenverlust und Zellinfiltration in diese Areale nach 7 Tagen I/R in MHC-PPAR- α Mäusen. Messbalken: 200 μ m. H.E. = Hämatoxylin-Eosin, WT = Wildtyp, d= Tage, I/R = Ischämie/Reperfusion, WT = Wildtyp, PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor- α .

4.4 Interstitielle Glykogenakkumulation

In den Kontrollgruppen beider Genotypen und in den ischämischen WT-Herzen konnten nach 7 Tagen I/R in der PAS-Färbung lediglich diskrete Ablagerungen von Glykogen nachgewiesen werden (Abb. 9 B). In den Arealen der Mikroinfarkte in MHC-PPAR- α -Mäusen zeigten sich hingegen vermehrte Glykogenablagerungen nach 7 Tagen I/R (Abb. 9 A). Die planimetrische Auswertung der PAS-positiven Fläche im Vergleich zu der linksventrikulären Wand bestätigte dies (Abb. 9 C).

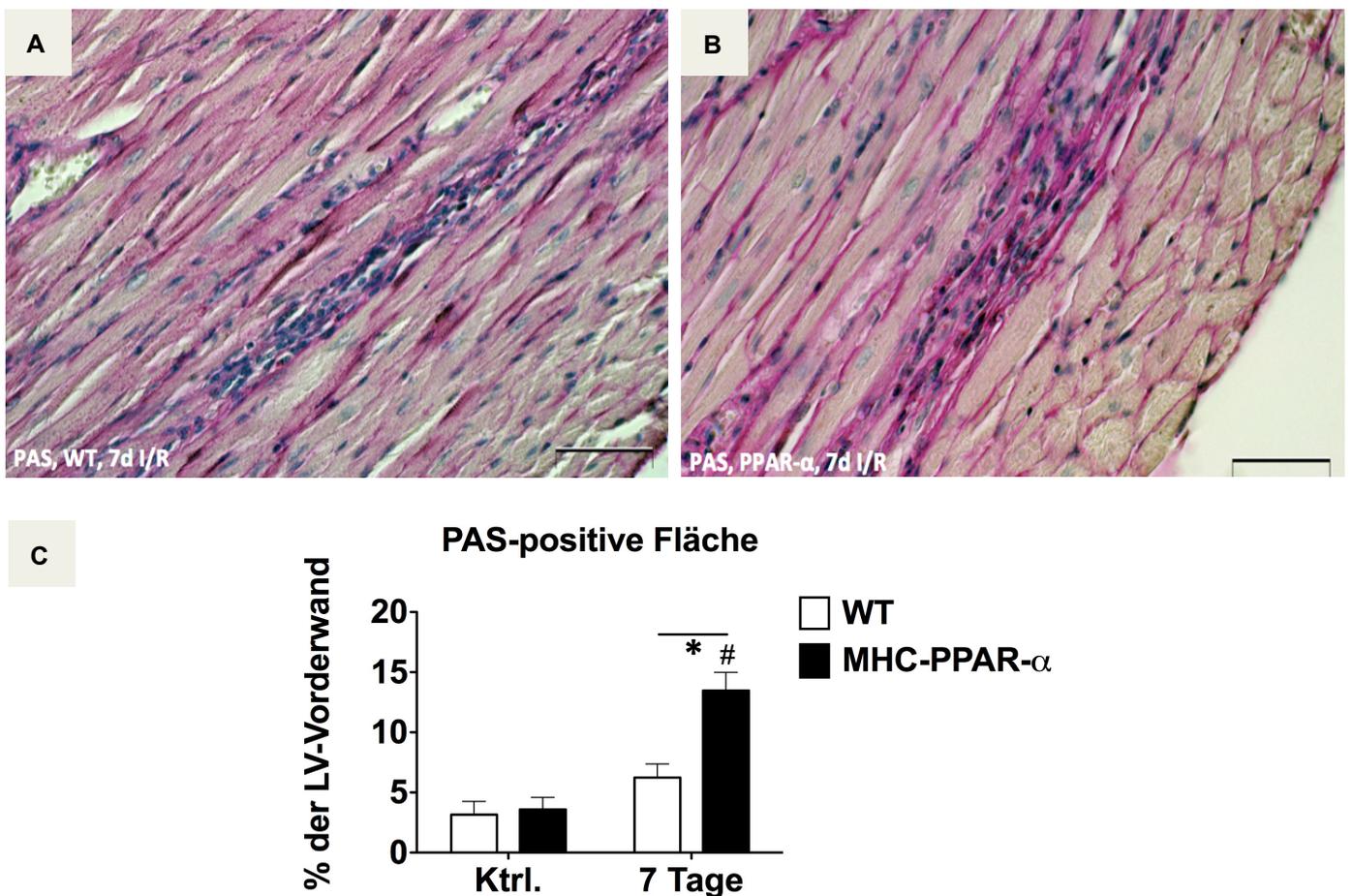


Abb. 9: Glykogenmessung in PAS-gefärbten Schnitten

(A) Repräsentative Färbung eines WT-Herzen nach 7 Tagen I/R zeigt wenig interzellulär abgelagertes Glykogen, während (B) MHC-PPAR- α Herzen nach 7 Tagen I/R viel Glykogen in den mikroinfarzierten Arealen aufweisen. (C) Planimetrische Messung des Glykogengehalts in beiden Genotypen. Messbalken in A und B: 50 μ m. PAS = Periodic acid Schiff, d= Tage, I/R = Ischämie/Reperfusion, WT = Wildtyp, PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α . * p < 0,05 zwischen den Genotypen; # p < 0,05 im Vergleich zu den jeweiligen Ktrl. Mäusen; WT: n = 8/Gruppe; MHC-PPAR- α : n = 6/Gruppe.

4.5 Apoptose und antioxidativer Schutz während repetitiver I/R

Kardiomyozyten-Apoptose wurde durch Caspase-3-Färbungen nachgewiesen, die lediglich wenige apoptotische Kardiomyozyten, in WT-Herzen nach 3 Tagen I/R demonstrieren. Der Pfeil markiert die in WT-Herzen spärlich hervorgebrachten Nuklei mit DNA-Fragmentation (Abb. 10 A). Im Gegensatz hierzu präsentierten MHC-PPAR- α -Mäuse eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten (Pfeil) in Mikroinfarkt-Arealen, bereits nach 3 Tagen I/R (Abb. 10 B). Die Caspase-3-mRNA Induktion war in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 3 Tagen I/R signifikant höher als in der Kontroll- und WT-Gruppe (Abb. 10 C).

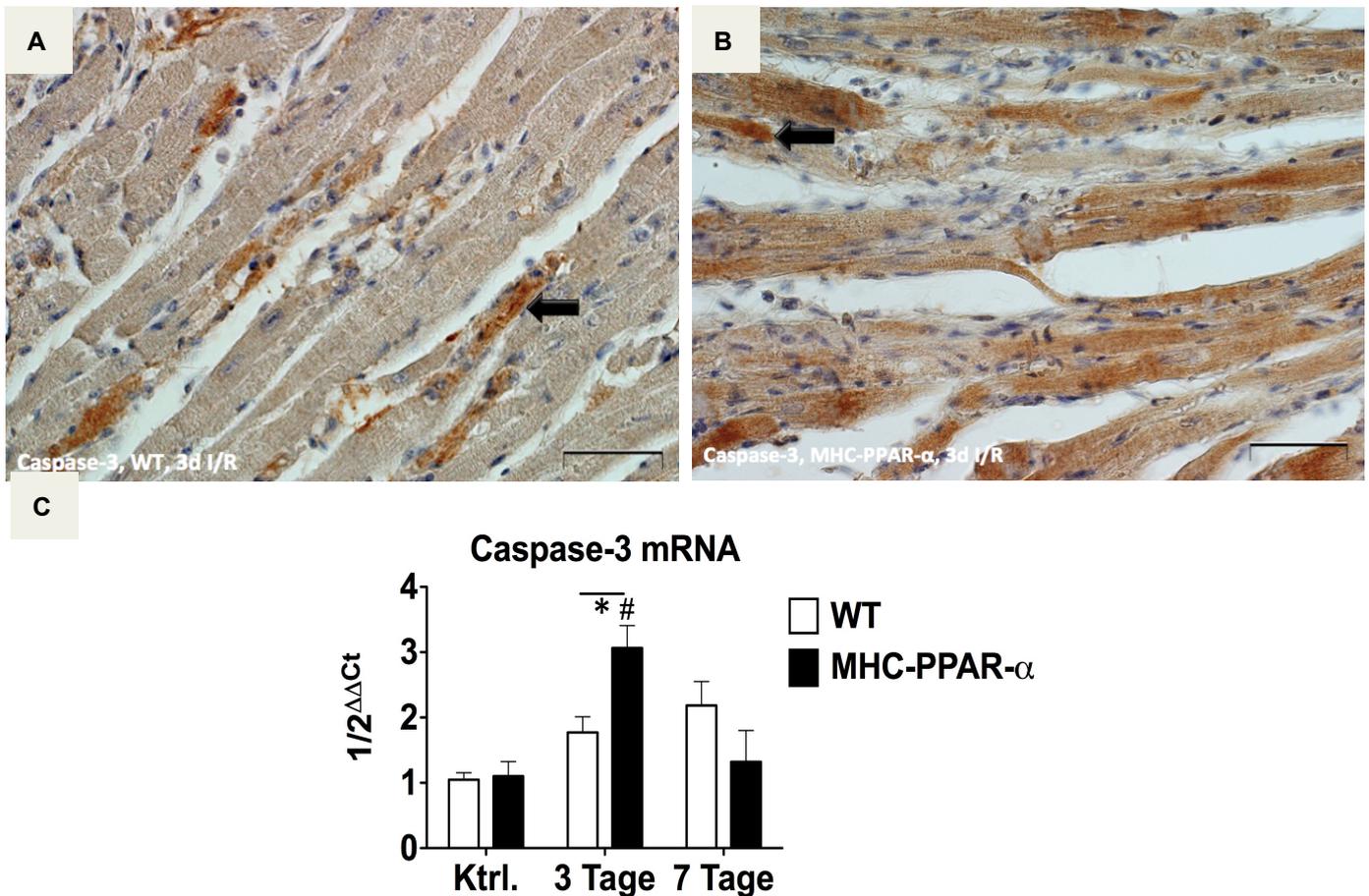


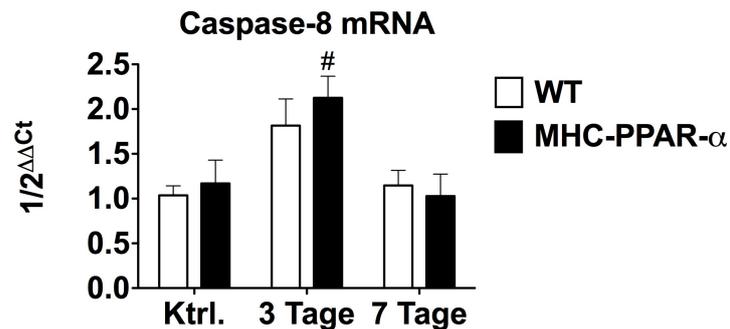
Abb. 10: Caspase-3-Färbung zur Detektierung apoptotischer Kardiomyozyten

(A) Färbung eines WT-Herzen nach 3 Tagen I/R zeigt wenig Apoptose, während (B) MHC-PPAR- α Herzen viel Apoptose nach 3 Tagen I/R aufwiesen. Messbalken in A und B: 50 μ m. (C) Planimetrische Messung des Apoptosegehaltes in beiden Genotypen. WT = Wildtyp, PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , d= Tage, I/R = Ischämie/Reperfusion. RT-qPCR mit Taqman[®], mRNA-Expression in Relation zu GAPDH und auf Kontrollgruppe (Ktrl.) bezogen unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode, * $p < 0,05$ zwischen den Genotypen; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: n = 8/Gruppe; MHC-PPAR- α : n = 6/Gruppe.

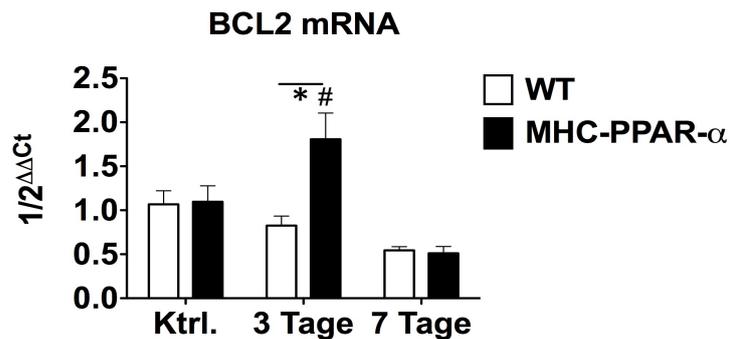
Die Caspase-8-mRNA Induktion, ein weiterer Marker des kardiomyozytären programmierten Zelltodes, war in beiden Genotypen nach 3 Tagen I/R vergleichbar (Abb. 11 A). BCL2, ein Marker der mitochondrialen Beteiligung in Apoptosemechanismen, wurde nach 3 Tagen I/R in MHC-PPAR- α -Mäusen signifikant hochreguliert. Nach 7 Tagen I/R wurde BCL2 jedoch deutlich in beiden Genotypen herunterreguliert (Abb. 11 B).

Die mRNA-Expression des antioxidativen Enzyms Hämoxigenase-1 (HMOX-1) war in den I/R-Gruppen zwischen den Genotypen vergleichbar und nach 3 Tagen I/R gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe signifikant induziert (Abb. 11 C). Im Gegensatz hierzu zeigten unsere Western-Blot-Analysen eine verringerte HMOX-1-Protein Induktionen in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 3 Tagen I/R verglichen mit den Kontroll- und WT-Mäusen (Abb. 11 E, mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. med. Daniel Dürr, (Duerr et al., 2014a)). Außerdem kam es nach 3 Tagen I/R in WT-Herzen zu einer signifikanten Induktion des NADPH-Oxidase-Regulator RAC-1 im Vergleich zu MHC-PPAR- α -Herzen (Abb. 11 D), was wiederum den protektiven Einfluss auf oxidativen Stress in WT-Herzen vermuten lässt. Zugleich weisen diese Daten auf eine Dysfunktion der antioxidativen Schutzmechanismen in MHC-PPAR- α -Mäusen hin.

A



B



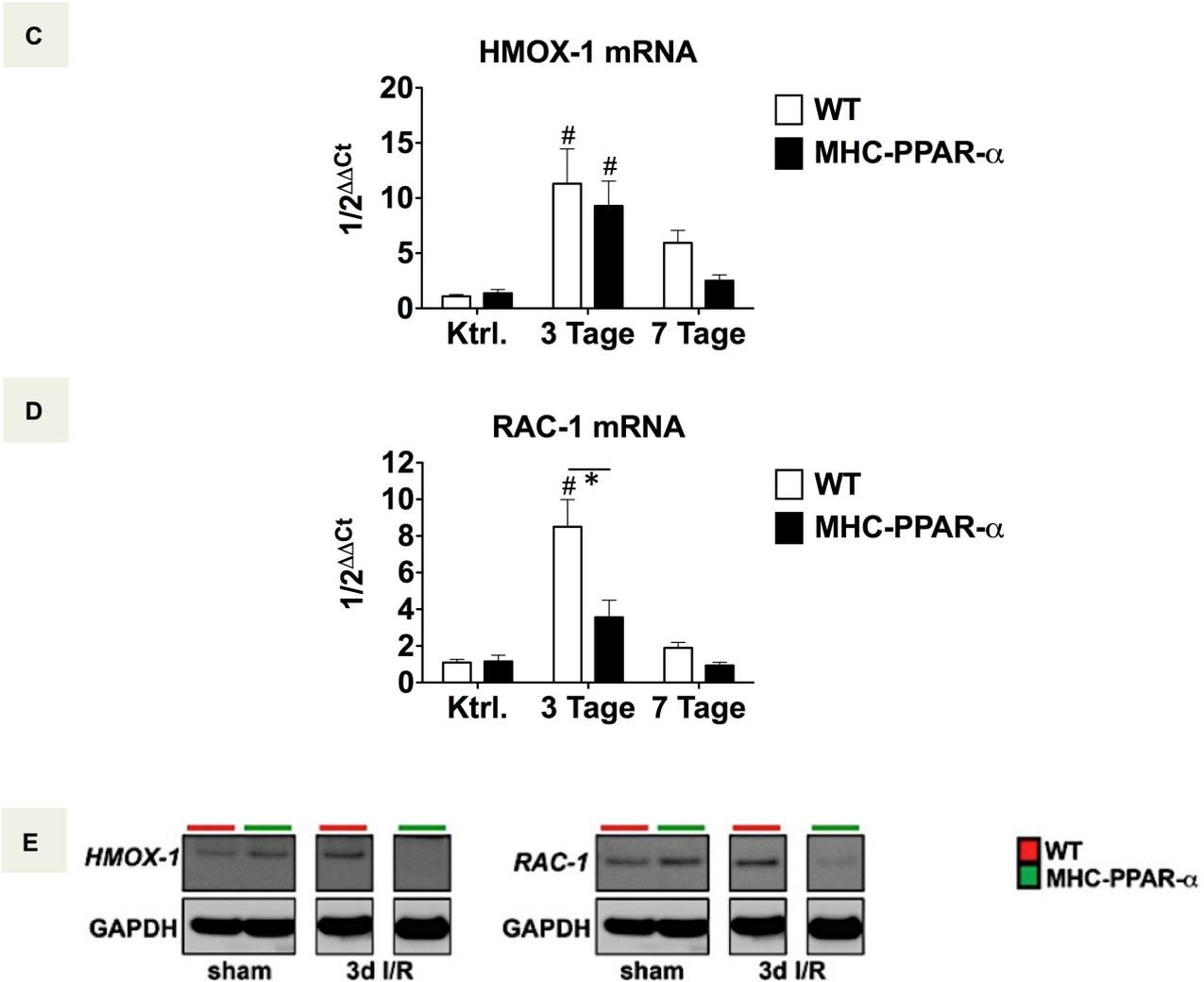


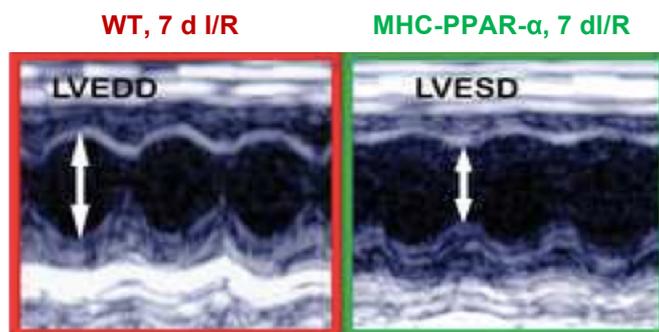
Abb. 11: mRNA-Expression der Caspase-8,, BCL-2, HMOX-1, und RAC-1 und Proteinexpression von HMOX-1 und RAC-1

Die mRNA-Expression der Apoptose-Mediatoren (A) Caspase-8 und (B) BCL-2 waren in WT-Mäusen im Gegensatz zu MHC-PPAR-α Mäusen nach 3 d I/R weniger induziert. Signifikante Induktion der (C) HMOX-1 mRNA-Expression in beiden Genotypen nach 3 Tagen I/R. (D) RAC-1 mRNA-Expression wurde nur in WT-Mäusen signifikant induziert. (E) Western Blot Analyse während repetitiver I/R zeigt eine reduzierte Proteinexpression von HMOX-1 in MHC-PPAR-α Mäusen und höhere Expressionen von RAC-1 Protein nach 3 Tagen I/R in WT-Mäusen (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. med. Daniel Dürr, (Duerr et al., Life Sciences, 2014a)). WT = Wildtyp, PPAR-α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α, d = Tage, I/R = Ischämie/Reperfusion. RT-qPCR mit Taqman[®], mRNA-Expression in Relation zu GAPDH und auf Kontrollgruppe (Ktrl. /sham) bezogen unter Verwendung der ΔΔCT-Methode, * p < 0,05 zwischen den Genotypen; # p < 0,05 im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: n = 8/Gruppe; MHC-PPAR-α: n = 6/Gruppe.

4.6 Linksventrikuläre Pumpfunktion

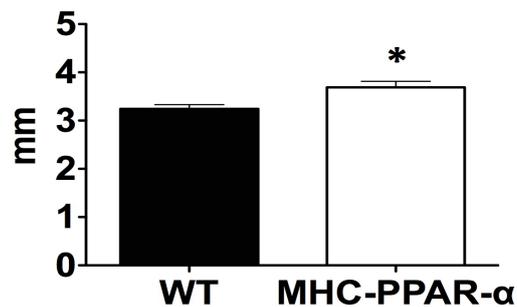
Echokardiographisch wurde eine signifikant schlechtere linksventrikuläre Pumpfunktion in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7 Tagen I/R (Abb. 12 A) nachgewiesen. Der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) war in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7 Tagen I/R signifikant erhöht (Abb. 12 B). Die Fraktionsverkürzung als Parameter für die globale Ventrikelfunktion und die anteriore Wandverdickung als regionaler funktioneller Parameter zeigten eine signifikant stärkere Dysfunktion in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7 Tagen I/R als in WT-Mäusen.

A



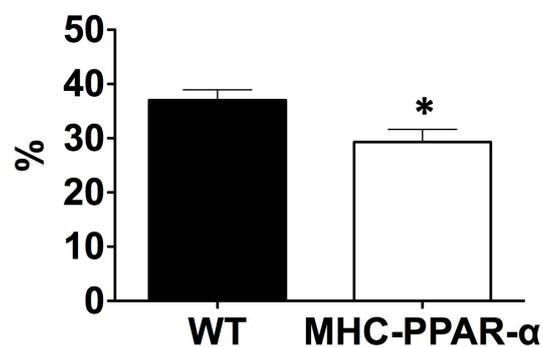
B

LVEDD nach 7 Tagen I/R



C

FS nach 7 Tagen I/R



D

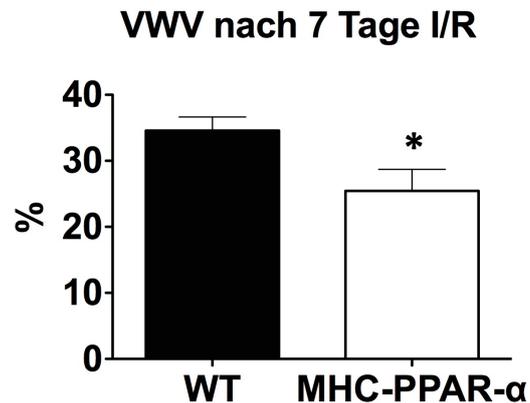
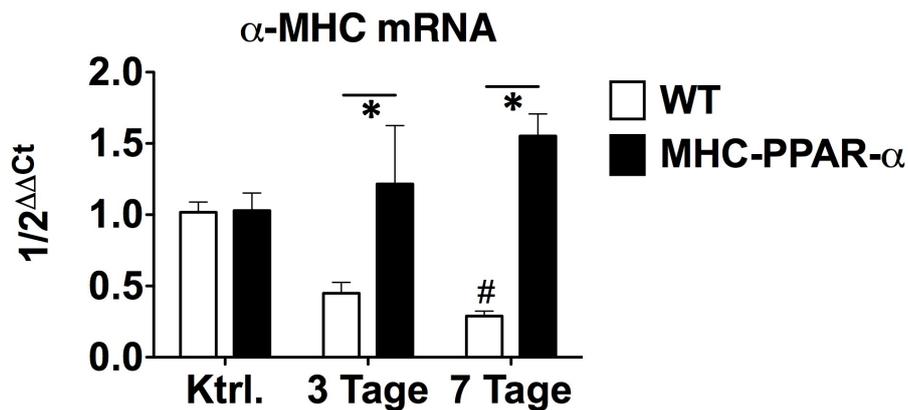


Abb. 12: Bestimmung der ventrikulären Pumpfunktion

(A) Repräsentative M-Mode-Echokardiographie bei WT- (rote Umrandung) und MHC-PPAR- α -Mäusen (grüne Umrandung) nach 7 Tagen I/R. (B) LVEDD zeigten eine signifikant schlechtere ventrikuläre Pumpfunktion in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7 Tagen I/R. (C) Die Fraktionsverkürzung und (D) die Vorderwandverdickung zeigten eine signifikant stärkere globale und regionale linksventrikuläre Dysfunktion in MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7 Tagen I/R. LVEDD = linksventrikulärer enddiastolische Diameter, LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, FS = Fraktionsverkürzung (engl. „fractional shortening“), VWV = Vorderwandverdickung, WT = Wildtyp, PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , I/R = Ischämie/Reperfusion. * $p < 0,05$ zwischen den Genotypen; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

Um die Adaptation der kontraktile Elemente in Kardiomyozyten während repetitiver Ischämieepisodes beurteilen zu können, untersuchten wir die mRNA-Expression der MHC-Isogene. WT-Mäuse regulierten die verstärkt ATP-konsumierende α -MHC-Isoform nach 7 Tagen deutlich herunter, während die MHC-PPAR- α -Mäuse dazu nicht in der Lage waren (Abb. 13 A). Im Gegensatz zu den WT-Mäusen waren die MHC-PPAR- α -Mäuse außerdem nicht in der Lage, die energetisch effizientere β -MHC-Isoform während repetitiver I/R zu induzieren, was eine beeinträchtigte adaptive Expression der kontraktile Elemente in MHC-PPAR- α -Mäusen zeigte (Abb. 13 B).

A



B

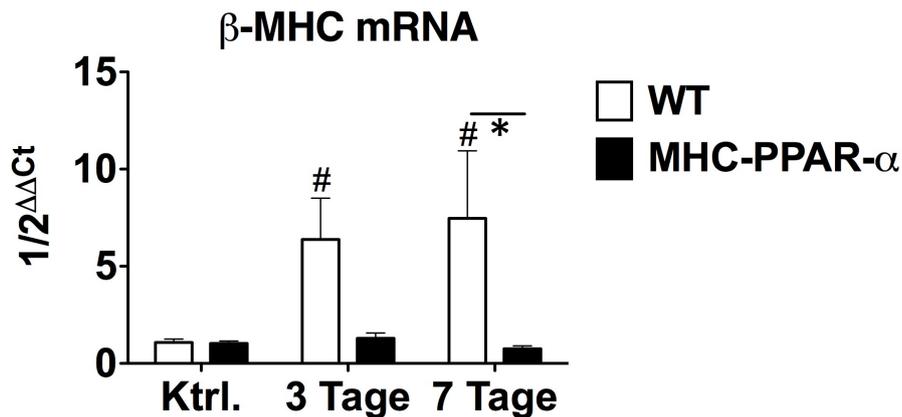
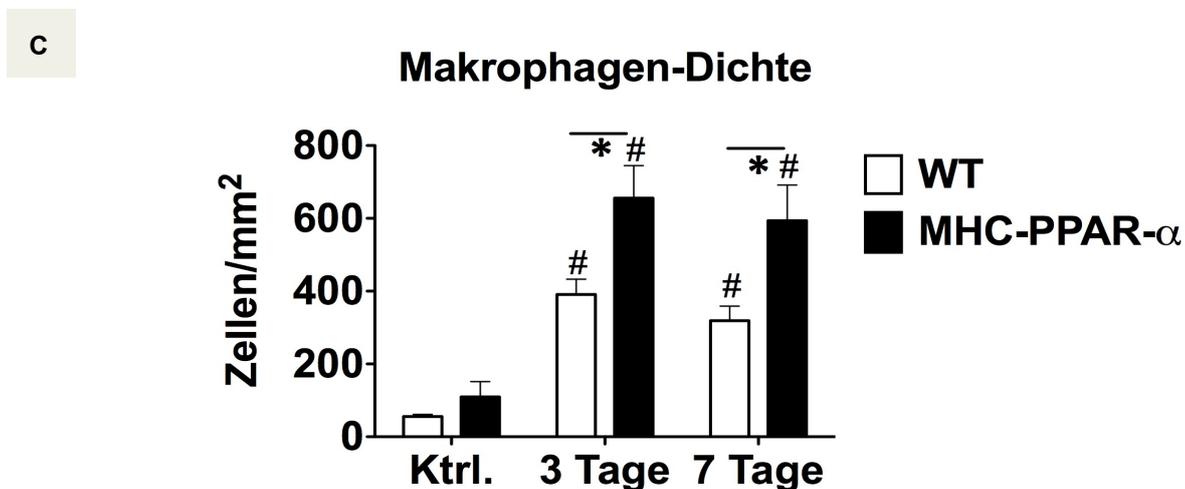
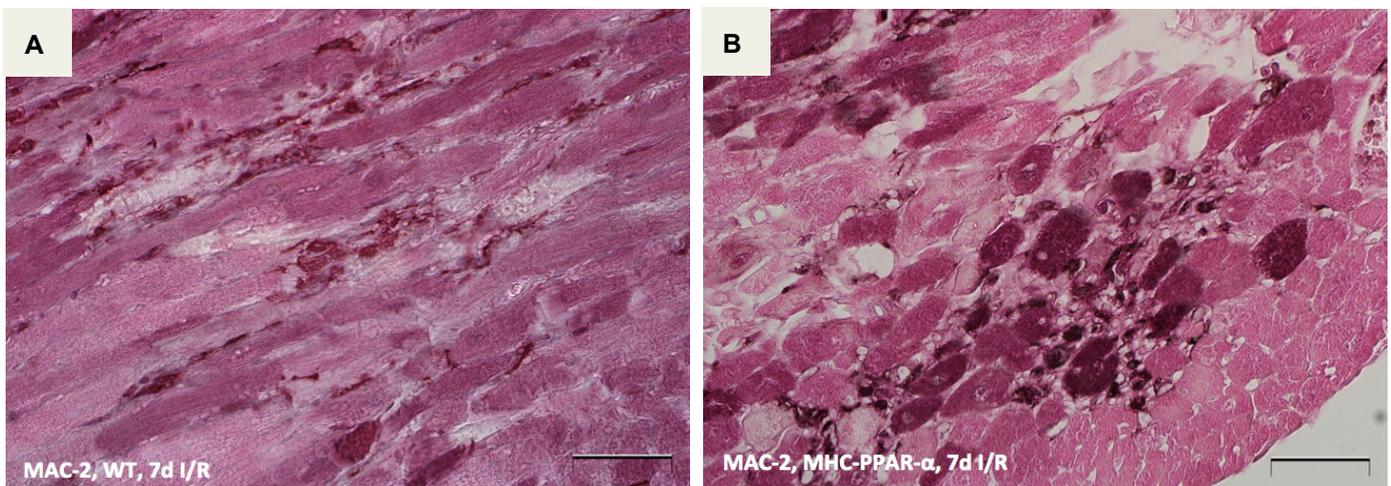


Abb. 13: MHC- α - und β -mRNA-Expression während des I/R Protokolls

(A) In MHC-PPAR- α Mäusen wurde die MHC α -mRNA signifikant nach 3 und 7 Tagen hochreguliert, während die WT-Mäuse eine signifikante Herunterregulation der von α -MHC zeigten. (B) MHC-PPAR- α Mäuse induzierten im Gegensatz zu WT-Mäusen α -MHC nach 3 und 7 Tagen I/R nicht. WT = Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , α - und β -MHC = Myosin heavy chains. RT-qPCR mit Taqman[®], mRNA-Expression in Relation zu GAPDH und genormt durch Kontrollgruppe (Ktrl.) unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode, * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

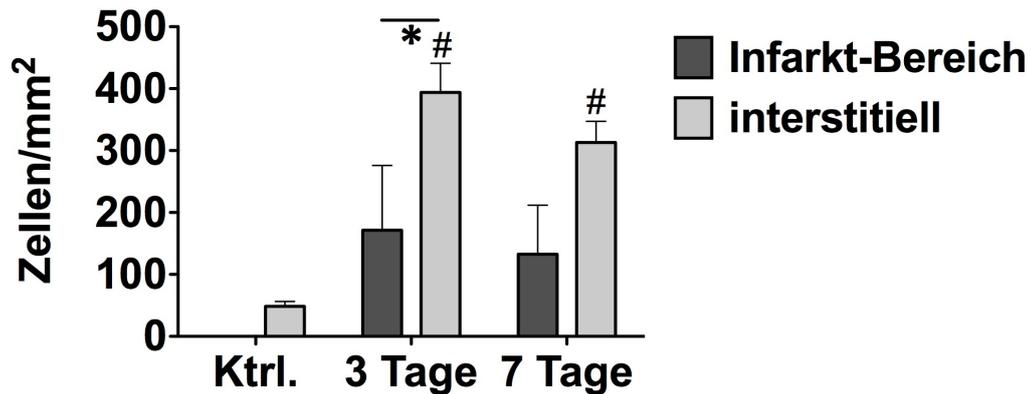
4.7 Inflammatorische Reaktion im ischämischen Myokard

Die immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen MAC-2 zur Detektierung von Makrophagen und deren quantitative Auswertung zeigte in den MHC-PPAR- α -Mäusen in den 3-Tagen und 7 Tagen-Guppen im Vergleich zu WT und Nativ- und Kontrollgruppe einen signifikant höheren Makrophagengehalt (Abb. 14 C). Eine differenzierte Analyse der Makrophageneinwanderung ergab bei WT-Hezen nach 3 Tagen I/R eine höhere Zelldichte im Interstitium als in den hier nur spärlich vorhandenen Mikroinfarktgebieten (Abb. 14 A und 14 D). Die MHC-PPAR- α -Mäuse hingegen wiesen nur wenige Makrophagen im Interstitium nach 3 Tagen I/R auf (Abb. 14 E). Im Gegensatz hierzu war eine vornehmliche Makrophagenakkumulation in Mikroinfarktgebieten der MHC-PPAR- α -Herzen erkennbar, die ihr Maximum nach 3 Tagen erreichte und nach 7-Tagen rückläufig war (Abb. 14 B und Abb. 14 E).

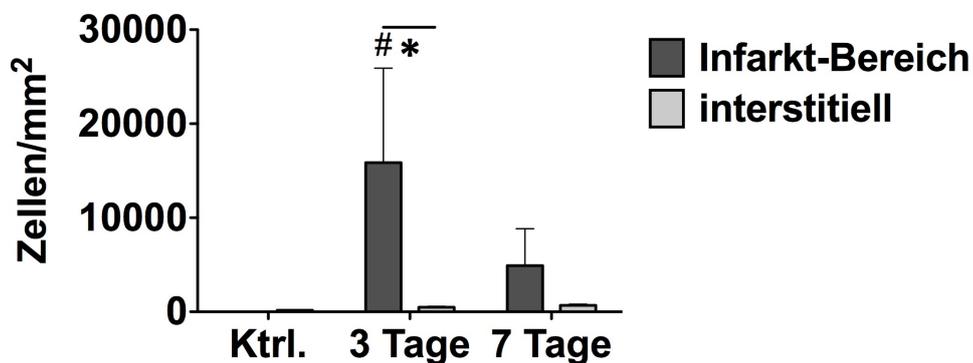


D

WT - diff. Makrophagen-Dichte



E

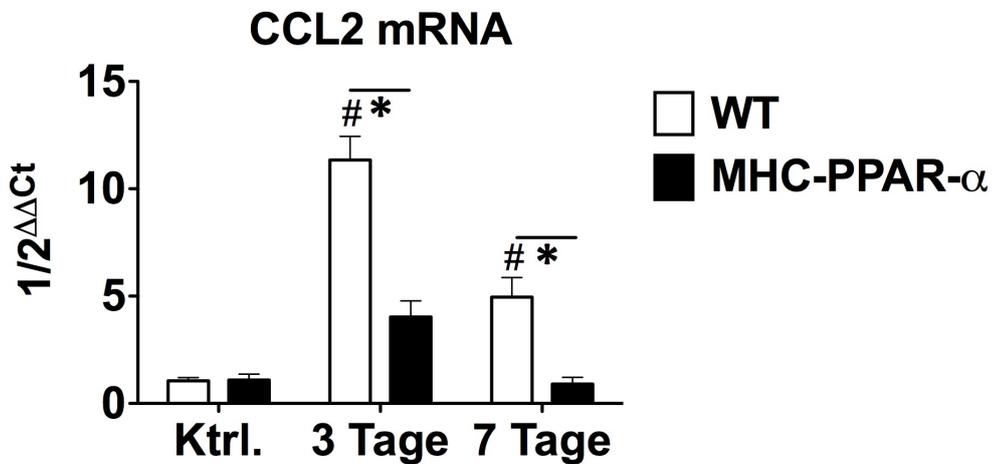
PPAR- α - diff. Makrophagen-Dichte**Abb. 14: Mac-2-Färbung zur Detektierung von Makrophagen**

MAC-2 Färbung der repräsentativen linksventrikulären Schnitte nach 7 Tagen I/R zeigen vornehmlich interstitiale Makrophageninfiltration in (A) WT-Mäusen, im Gegensatz zur erhöhten Makrophagendichte in Mikroinfarktarealen in (B) MHC-PPAR- α -Mäusen nach 7d I/R. (C) Quantitative Darstellung der erhöhten Makrophagendichte in WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen nach 3 und 7 d I/R. Die Makrophagenverteilung im ischämischen Myokard wird differenziert in vor allem interstitielle Infiltration in (D) WT- und Infiltration in Mikroinfarktareale in (E) MHC-PPAR- α -Herzen. Messbalken: 50 μ m. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

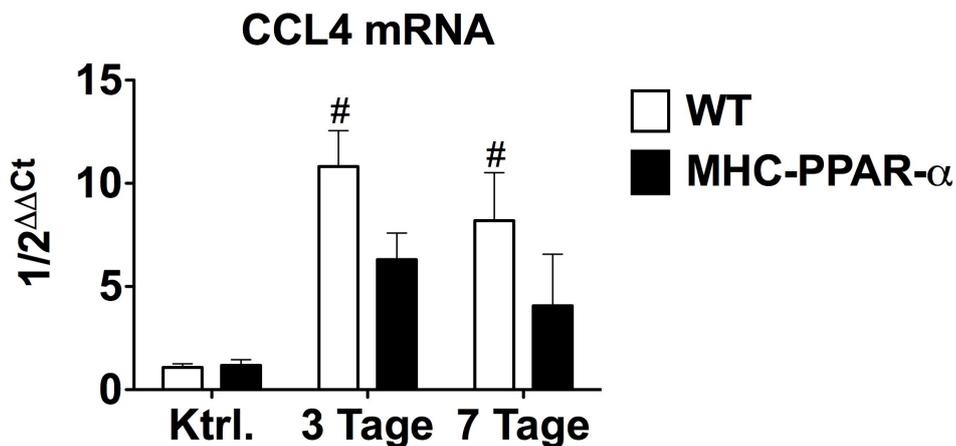
4.8 Initiierung und Modulation der Inflammation

Im Zuge der Untersuchungen der inflammatorischen Reaktion wurde die Expression von makrophagen- und neutrophilenassoziierten Chemokinen gemessen. CCL2 und CCL4 spielen eine wichtige Rolle in der Makrophagenattraktion und Entzündungsreaktion (Dewald et al. 2005b; Lu et al. 1998; Frangogiannis et al. 2007) wohingegen CCL3 eine entscheidende Rolle in der Neutrophilenattraktion zugesprochen wird (Maurer und von Stebut, 2004). CCL2 war lediglich in WT-Mäusen nach I/R signifikant induziert, nicht jedoch in MHC-PPAR- α -Mäusen (Abb. 15 A). Dieselbe Kinetik wies auch die CCL4-Expression auf (Abb. 15 B). Die Induktion der mRNA des neutrophilenchemotaktischen Chemokins CCL3 war in den Genotypen vergleichbar, wenngleich eine signifikante Induktion bei den 3-Tage-MHC-PPAR- α -Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe sichtbar wurde. (Abb. 15 C).

A



B



c

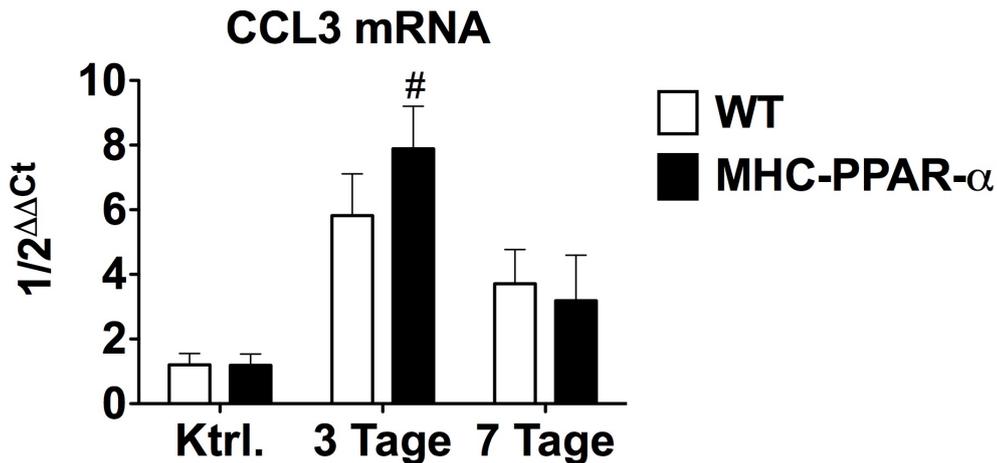
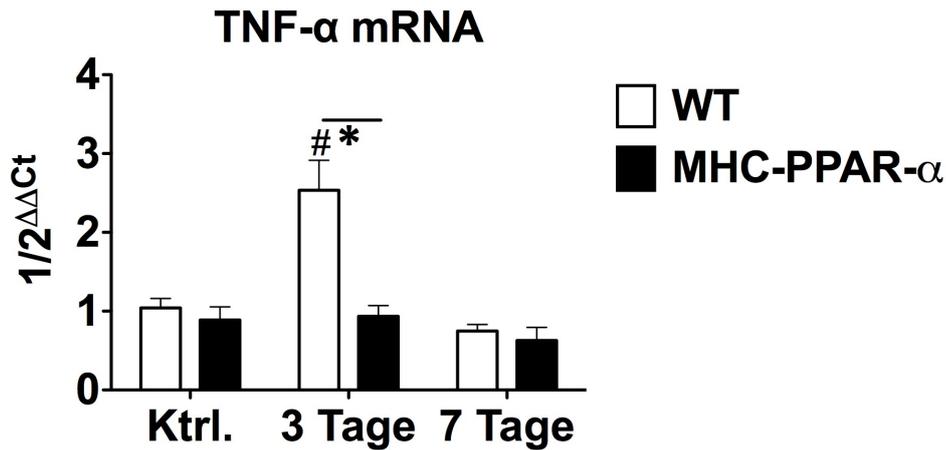


Abb. 15: Vergleich der mRNA-Expression inflammatorischer Mediatoren

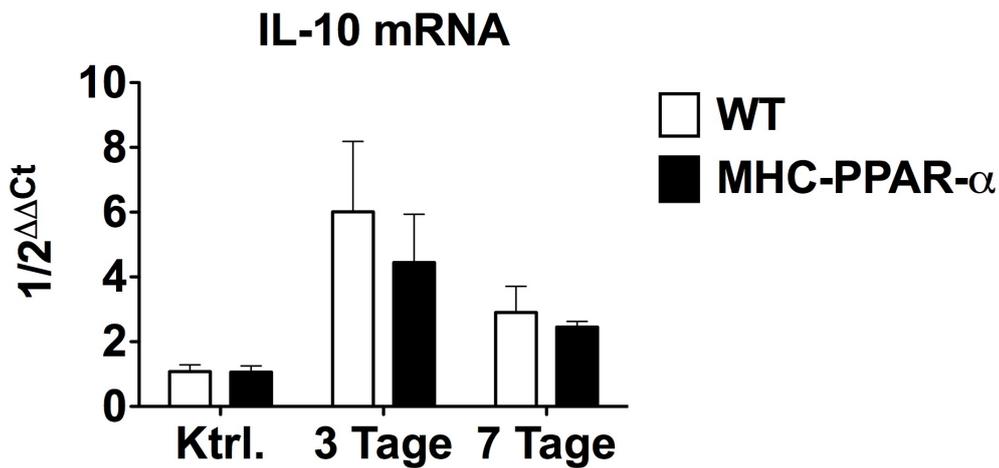
Die mRNA-Expression der Makrophagen-assoziierten Chemokinen zeigte eine signifikante Induktion von (A) CCL2- und (B) CCL4 in den WT-Mäusen, nicht jedoch in den MHC-PPAR- α -Mäusen. Das Neutrophilen-assoziierte Chemokin (C) CCL3 war in WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen induziert. WT = Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , RT-qPCR mit Taqman[®], mRNA-Expression in Relation zu GAPDH und genormt durch Kontrollgruppe (Ktrl.) unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: $n = 8/\text{Gruppe}$; MHC-PPAR- α : $n = 6/\text{Gruppe}$.

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wurde in den WT-Mäusen nach 3 Tagen I/R signifikant hochreguliert, im Gegensatz zu dessen fehlender Induktion in MHC-PPAR- α -Mäusen. (Abb. 16 A). Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wies eine vergleichbare Induktion in beiden Genotypen auf, das auf die rechtzeitige Auflösung der inflammatorischen Reaktion in beiden Mäusegruppen hinweist (Abb. 16 B). Die Osteopontin-1 (OPN-1)-Expression war nach 3 Tagen I/R in WT-Mäusen signifikant angestiegen. Dies lässt ein frühes Einsetzen der Makrophagenreifung in WT-Mäusen, einhergehend mit dem rechtzeitigen Auflösen der inflammatorischen Reaktion und dem myokardialen Geweumbau vermuten (Murry et al. 1994; Frangogiannis et al. 2002a) OPN-1 ist ein wichtiger Marker der Bildung von Extrazellulärmatrix. Die fehlende Induktion des OPN-1 in MHC-PPAR- α -Herzen könnte als Hinweis auf die noch nicht eingesetzte Auflösung der Entzündungsreaktion verstanden werden.

A



B



C

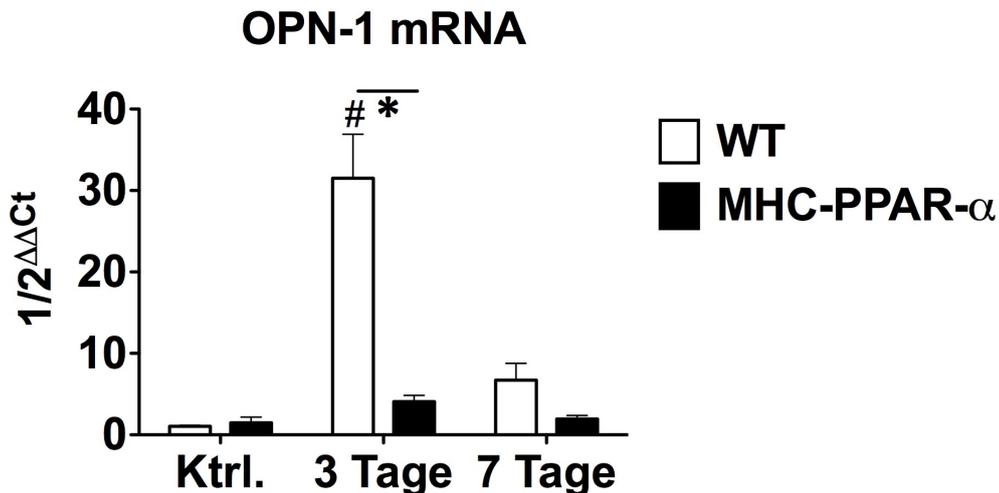


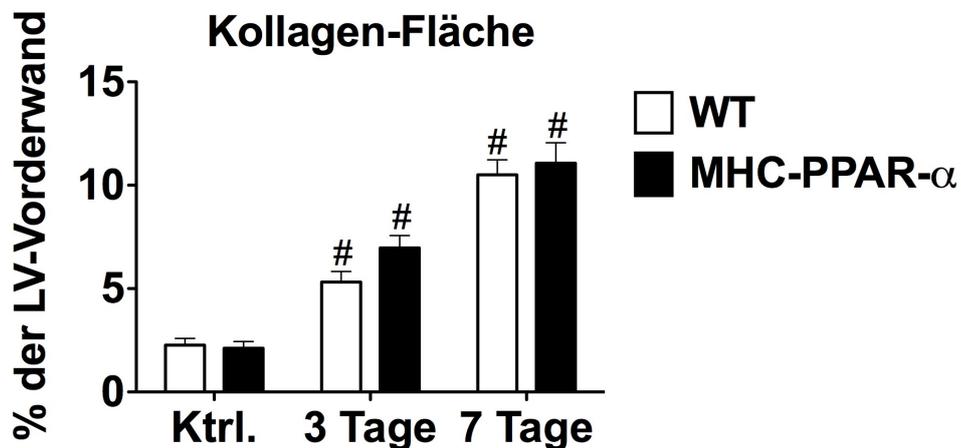
Abb. 16: Vergleich der mRNA-Expression der Zytokine

Die mRNA-Expression der Zytokine (A) TNF- α und (C) Osteopontin 1 (OPN-1) zeigte eine signifikante Induktion nach 3 Tagen I/R in WT- und fehlende Induktion in MHC-PPAR- α -Mäusen. Die mRNA-Expression von (B) Interleukin 10 (IL-10) wies eine vergleichbare Induktion in beiden Genotypen auf. WT = Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , RT-qPCR mit Taqman[®], m-RNA-Expression in Relation zu GAPDH und genormt durch Kontrollgruppe (Ktrl.) unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ im Vergleich zu Ktrl.; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

4.9 Fibrosebildung

Die Kollagenablagerung im Rahmen des interstitiellen Gewebeumbaus nach I/R zeigte bereits eine deutliche Zunahme in WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen nach 3 Tagen I/R mit einem maximalen Kollagengehalt im ischämischen Myokard nach 7 Tagen. Dieser zeitliche Verlauf mit fortschreitender Zunahme des Fibroseareals konnte bei WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen gleichermaßen beobachtet werden (Abb. 17 A). Es waren jedoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Kollagenanhäufung zu erkennen: Der Kollagenanteil in den mikroinfarzierten Bereichen betrug ca. 18 % in der MHC-PPAR- α Gruppe (Abb. 18 B) und war im Vergleich zu den Wildtypen (ca. 3 %) (Abb. 18 A) nach 7 Tagen I/R deutlich höher (Abb. 17 B).

A



B

Kollagen-Fläche im Infarkt, 7 Tage I/R

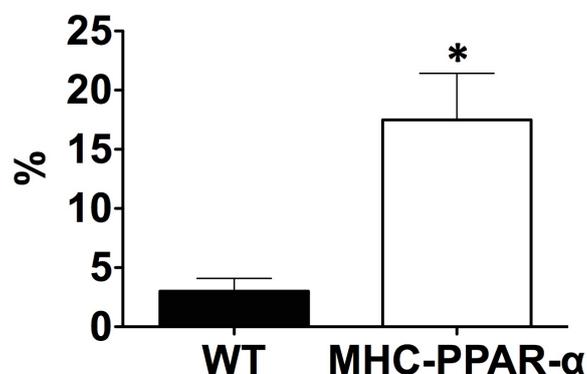


Abb. 17: Gesamte Kollagenfläche und Kollagenfläche in Mikroinfarkten

Während die planimetrische Auswertung der Sirius-Rot-Färbungen eine vergleichbare (A) gesamte Kollagenfläche in beiden Genotypen nach 7 Tagen I/R zeigt, ist die (B) Kollagenfläche der Mikroinfarkt-Areale der linksventrikulären Vorderwand signifikant höher in MHC-PPAR- α -Mäusen, verglichen mit den WT-Mäusen. WT = Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , $p < 0,05$; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

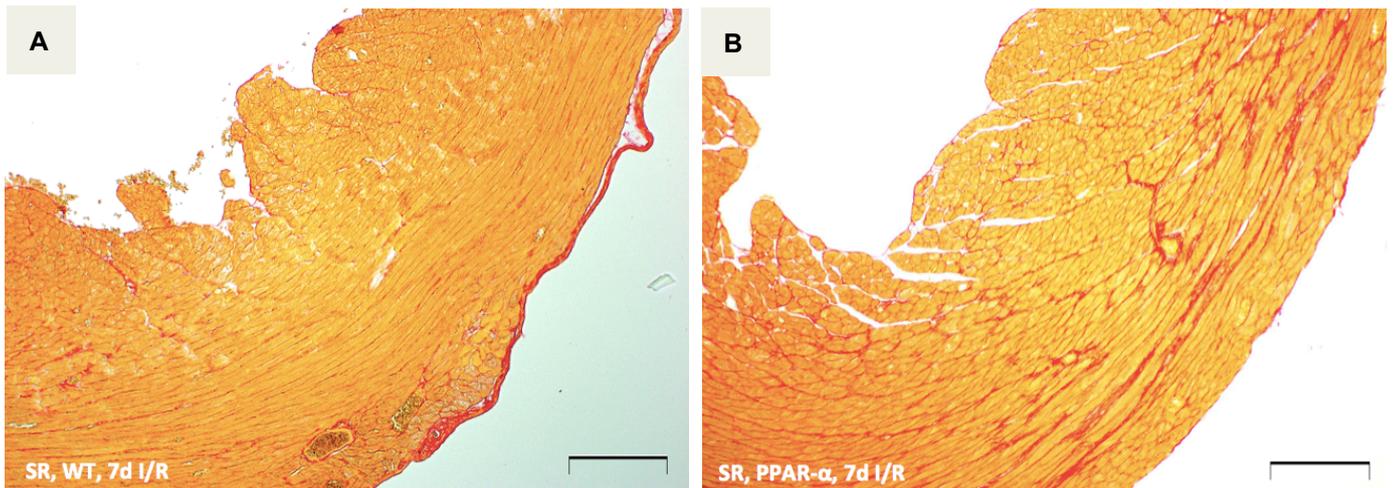


Abb. 18: Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand in WT und MHC-PPAR- α nach 7 Tagen I/R mittels Sirius-Rot-Färbung

Repräsentative Schnitte von (A) Wildtyp- und (B) PPAR- α -Herzen nach 7 Tagen I/ zeigen (A) prädominant interstitielle Kollagenablagerung in WT-Herzen nach 7 Tagen I/R, aber (B) deutlich stärkere Kollagenablagerung in Mikroinfarkten-Arealen der MHC-PPAR- α -Herzen nach 7 Tagen I/R. Messbalken: 200 μ m. SR = Sirius-Rot, WT= Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α .

4.10 Myofibroblastendifferenzierung und Gewebeumbau

Die α -smooth muscle actin (α -SMAC)-gefärbten Herzschnitte dienen zur Detektierung von Myofibroblasten, die eine zentrale Rolle in der Kollagenbildung spielen. In WT-Mäusen konnte nach 3 Tagen I/R nur ein schwaches Signal α -SMAC-positiv gefärbter Myofibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 19 A), während die Mikroinfarkte in MHC-PPAR- α -Herzen zahlreiche Myofibroblasten enthielten (Abb. 19 B). Der Zellreichtum weist deutlich auf einen zu diesem Zeitpunkt verstärkten Gewebeumbau in diesen Mäusen hin. Die planimetrische Auswertung dieser α -SMAC-gefärbten Areale zeigte einen signifikant höheren Anteil von α -SMAC an der Gesamtfläche in MHC-PPAR- α Herzen nach 3 und 7 Tagen (Abb. 19 C).

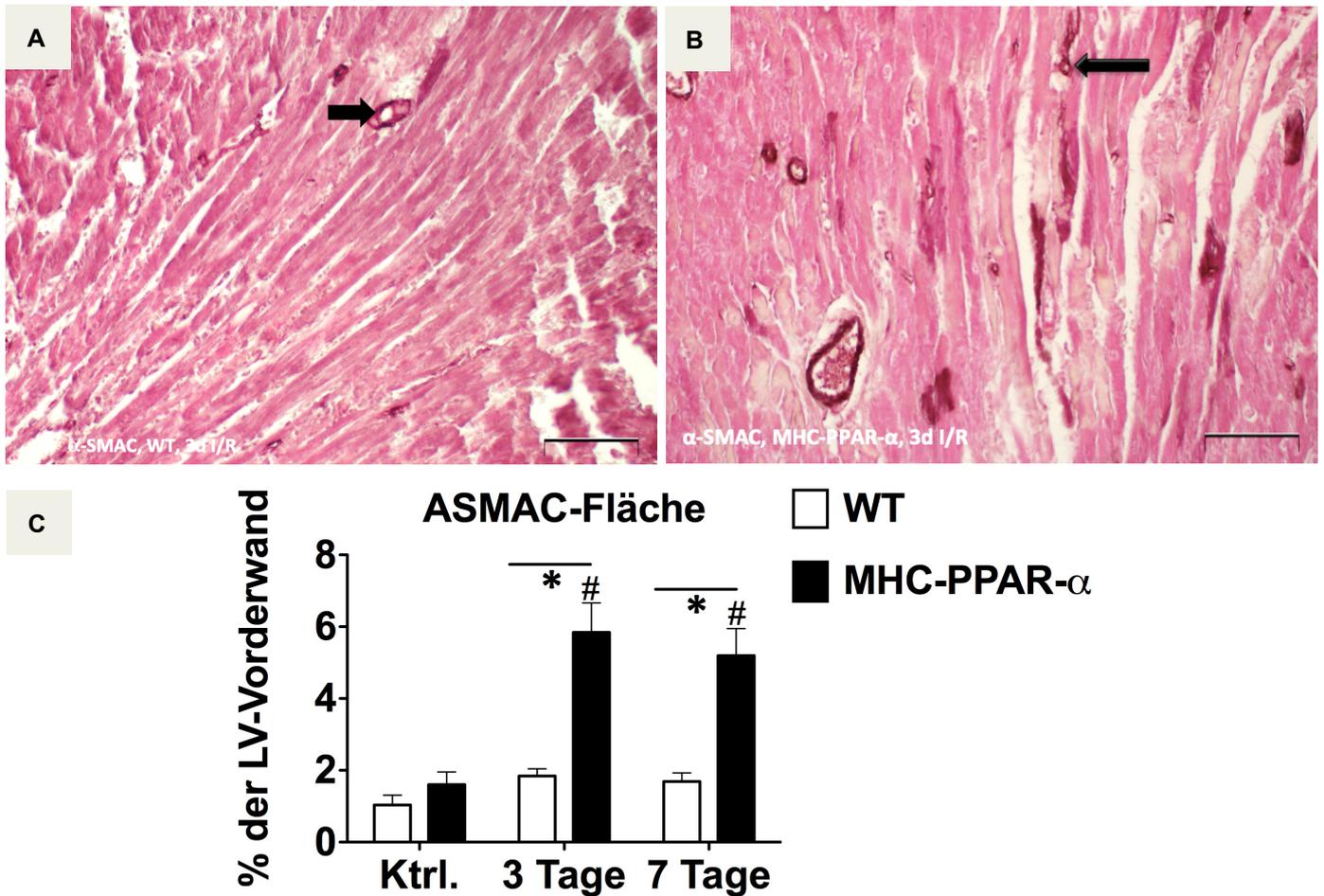


Abb. 19: α SMAC-Färbung zur Detektierung des kardialen Gewebeumbaus

In repräsentativen α SMAC-Färbungen können (A) in WT-Mäusen nach 3 d I/R nur wenige interstitielle Myofibroblasten nachgewiesen werden (Pfeilspitze markiert α -SMAC-positive Färbung in Ateriolen als Positivkontrolle der Färbung), im Gegensatz zu (B) zahlreichen Myofibroblasten (Pfeilspitze) in ischämischen und Mikroinfarkt-Arealen in MHC-PPAR- α -Mäusen. (C) Die quantitative planimetrische Auswertung der α -SMAC-Färbung zeigt eine signifikant höhere Myofibroblasten-Anreicherung in MHC-PPAR- α -Mäusen. Messbalken: 100 μ m, *p < 0,01; # p < 0,05 im Vergleich zu Ktrl.; WT: n=8/Gruppe; MHC-PPAR- α : n=6/Gruppe.

Tenascin C, ein Marker für den frühen Gewebeumbau, wird in WT-Mäusen als feine interstitielle Signale im ischämischen linken Ventrikel nach 7 Tagen I/R auf (Abb. 20 A). Im Gegensatz dazu wurden bei MHC-PPAR- α -Mäusen fast keine Tenascin-positive Zellen angefärbt (Abb. 20 B). Korrelierend hierzu war die Tenascin-mRNA-Expression und -Induktion in MHC-PPAR- α -Mäusen signifikant niedriger (Abb. 20 C).

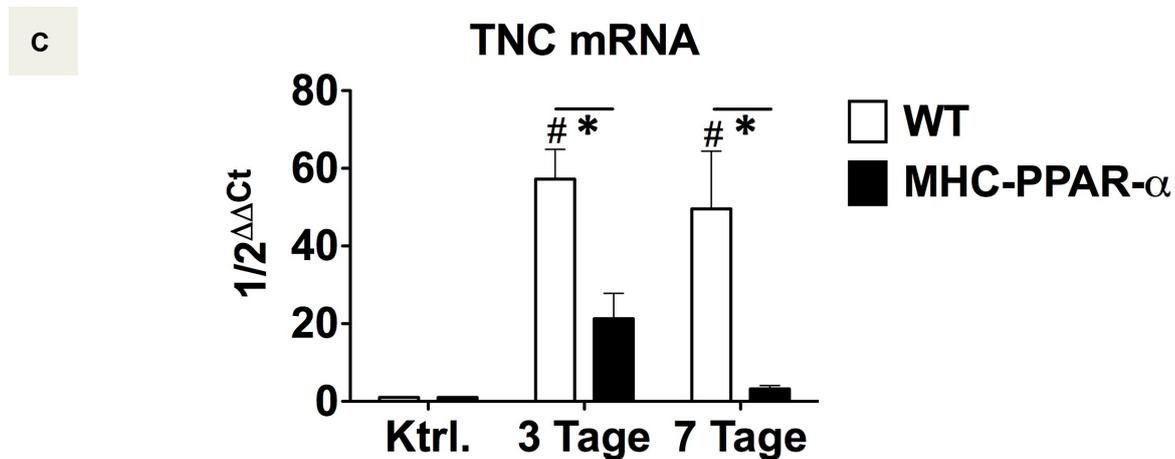
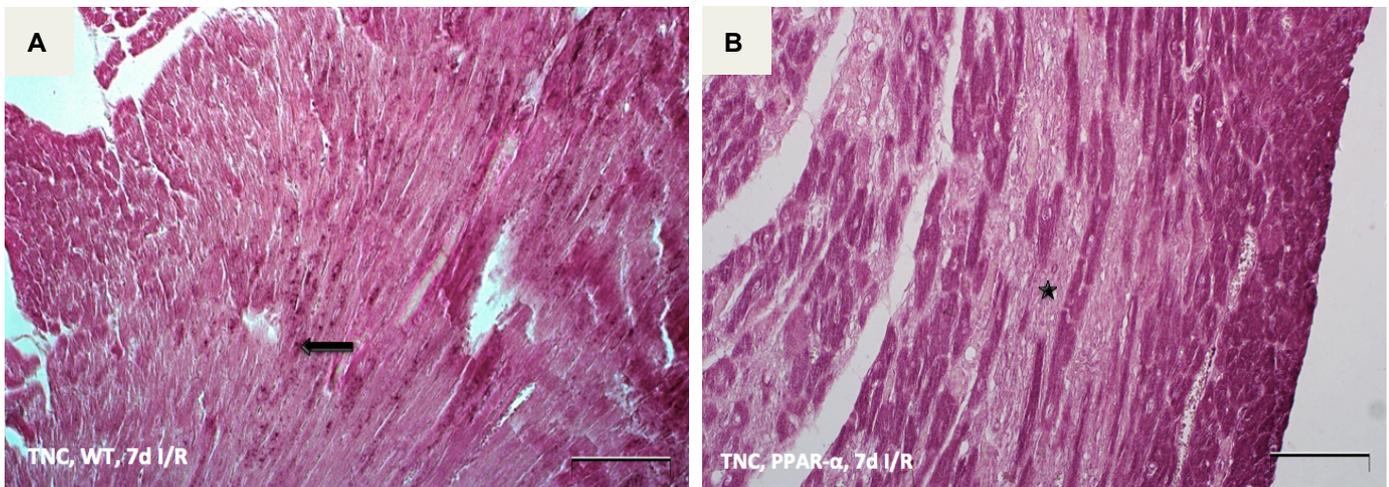


Abb. 20: TNC-Färbung zur Bestätigung eines frühen Gewebeumbaus

Repräsentative Färbungen des frühen Gewebeumbau markers TNC zeigen die feine interstitielle Ablagerung (Pfeilspitze) nach 7 Tagen I/R in (A) WT-Mäusen. In (B) MHC-PPAR- α -Mäusen konnten fast keine interstitiellen Signale von TNC in Mikroinfarktarenalen (durch Stern markiert) nachgewiesen werden. (C) Auswertung der TNC-mRNA Expression in WT-Mäusen und in MHC-PPAR- α -Mäusen. Messbalken: 100 μ m (A und B), WT = Wildtyp, MHC-PPAR- α = Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor α , TNC = Tenascin C, RT-qPCR mit Taqman[®], m-RNA-Expression in Relation zu GAPDH und genormt durch Kontrollgruppe (Ktrl.) unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode, * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ im Vergleich zu WT Ktrl.; WT: $n = 8$ /Gruppe; MHC-PPAR- α : $n = 6$ /Gruppe.

In der vorliegenden Arbeit konnten neuartige Erkenntnisse kardioprotektiver Mechanismen im ischämischen Mäuseherzen anhand von kardiomyozytenspezifischer PPAR- α -Überexpression gewonnen werden. Diese ging mit einer erhöhten Glykogen-Deposition und Apoptose einher, begleitet von irreversiblen Kardiomyozytenverlust trotz teilweise erhaltener Induktion von antioxidativen Mediatoren. Die inflammatorische Reaktion war verlängert und assoziiert mit verzögertem, kardialen Gewebeumbau. Dies resultierte in verstärkter Narbenbildung und verschlechterter ventrikulärer Pumpfunktion in diesen Herzen im Vergleich zu den WT-Mäusen.

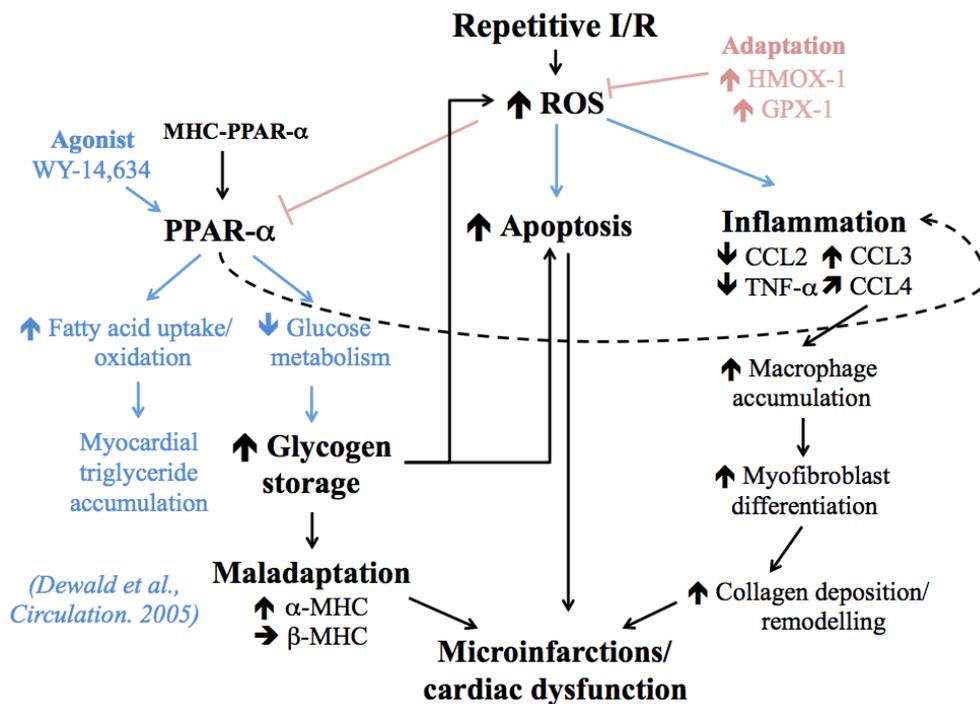


Abb. 21: Schematische Darstellung der Rolle von PPAR- α im ischämischen Herzen (Duerr et al., 2014a)

5. Diskussion

PPAR- α ist ein ligandengesteuerter nukleärer Transkriptionsfaktor, der viele Proteine und Enzyme des Fettsäuremetabolismus reguliert (Barger und Kelly, 2000). Von allen PPAR-Isoformen ist PPAR- α am höchsten im Myokard exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des kardialen Metabolismus auf Transkriptionsebene (Barger & Kelly, 2000; Finck et al, 2007). Zudem ist PPAR- α an zahlreichen inflammatorischen Prozessen beteiligt und wird direkt von der vermehrten ROS-Produktion nach repetitiver I/R beeinflusst (Dewald et al., 2005b; Smeets et al., 2007).

In der akuten Ischämie wird charakteristischerweise ein Wechsel des myokardialen Metabolismus hin zur anaeroben Glykolyse beobachtet (McNulty et al., 2000). Das Herz metabolisiert dann vorrangig Glukose anstelle von Fettsäuren und verändert auch in Abhängigkeit einer hypertonen Druckbelastung oder Hypoxie diese Substratpräferenz (Razeghi et al., 2001a; Young et al., 2001). Dieser beobachtete Substratwechsel wird von der Herunterregulation der PPAR- α -Genexpression und -Aktivität begleitet (Barger & Kelly, 2000; Dewald et al., 2005b). Glukose gilt als der effizientere Energielieferant für die ATP-Erzeugung im Myokard bei Sauerstoffverbrauch, im Vergleich zu Fettsäuren (Taegtmeyer, 2002). Fettsäuren erzielen darüber hinaus nachteilige Langzeiteffekte im postischämischen Herzen im Sinne eines Laktatanstiegs und der vermehrten Protonenproduktion im Myokard, die mit einem Anstieg des intramyokardialen pH-Wertes assoziiert ist und zu einer kontraktile Dysfunktion führt (Lopaschuk et al., 1993). Daher geht man davon aus, dass die PPAR- α Herunterregulation und der damit assoziierte Substratwechsel im gestressten Herzen einen adaptiven Schutzmechanismus darstellt, der nicht nur eine effizientere Energieumwandlung ermöglicht, sondern auch die Integrität der kontraktile Funktion des Herzens wahren soll, während die Reaktivierung von PPAR- α zu einer Umkehrung dieser Vorgänge und somit zu myokardialer Dysfunktion führt (Dewald et al., 2005b; Finck et al., 2002; Young et al., 2001).

Auch der Ernährungszustand des Patienten und die pathophysiologischen Umstände können die Variation der Substratverwertung im erwachsenen gesunden Herzen von Fettsäuren zu Glukose induzieren, um dem entsprechenden benötigten Energieaufwand gerecht werden zu können (Finck et al., 2002; Neely et al., 1972). Dieser flexible Sub-

stratwechsel ist jedoch im diabetischen Herzen aufgrund einer insulininduzierten Dysregulation der myokardialen Glukoseaufnahme und -verwertung gestört (Finck et al., 2002). Es werden vornehmlich mitochondriale Fettsäuren zur ATP-Herstellung verwendet (Finck et al., 2002; Neely et al., 1972). Ein multifaktorielles Geschehen aus modifiziertem Fettsäuremetabolismus, intramyokardialer Triglyceridüberladung und kontraktile Dysfunktion ist hier charakteristisch für die kardiale Lipotoxizität (Schaffer, 2003). Die kardiale Überexpression von Genen wie PPAR- α , die den Fettsäuremetabolismus regulieren, verursacht eine lipotoxische Kardiomyopathie, welche der Pathologie im diabetischen Herzen ähnlich ist. (Chiu et al., 2001, 2005; Finck et al., 2002). Des Weiteren konnten Dewald et al. einen schädlichen Effekt der PPAR- α -Aktivierung im Mausmodell der repetitiven kurzen I/R nachweisen, da der PPAR- α Agonist WY-14,643 mit Entstehung von Mikroinfarkten und Lipotoxizität assoziiert war; Außerdem war die Aktivierung von PPAR- α von erhöhter myokardialer Triglycerid-Ablagerung, gesteigerter Fettsäureoxidation und eingeschränkter kardialer Funktion begleitet (Dewald et al., 2005b).

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die repetitive I/R zu einer reversiblen myokardialen Dysfunktion und zu einem gesteigerten Glukosemetabolismus in Rattenherzen führt (Kim et al., 2003). Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Behandlung von Kardiomyoblasten und isolierten Kardiomyozyten mit hochdosierter Glukose (H9C2) zu Zelltod *in vitro* führt (Younce et al., 2010). Andere Studien mit Verwendung von PPAR- α -Agonisten diskutieren den kardioprotektiven Einfluss von PPAR- α Agonisten. Doch die kontroversen Daten dieser Studien zeigen die Schwierigkeiten der pharmakologischen Einflussnahme. (Bulhak et al., 2006; Hafstad et al., 2009; Yue et al., 2003; Wayman et al., 2002; Devchand et al., 1996). Um diese potentiellen Probleme bei der pharmakologischen Aktivierung von PPAR- α auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer PPAR- α Überexpression (Expression von PPAR- α unter α -myosin heavy chain (MHC, auch Myosin-6)) verwendet (Finck et al., 2002).

5.1 Mausmodell der repetitiven I/R

Die Entstehung der ventrikulären Dysfunktion im Kleintiermodell wird maßgeblich durch eine inflammatorische Reaktion im Rahmen der Reperfusion eines ischämischen Myokardareals vermittelt. Dieses verwendete Mausmodell zeigt folgende charakteristische Merkmale des menschlichen hibernierenden Myokards: 1. transiente Inflammationsreaktion, 2. reversible interstitielle Fibrose, 3. reversible regionale ventrikuläre Dysfunktion, ohne einen Myokardinfarkt herbeizuführen: sie ist hiermit dem hibernierenden Myokard ähnlich (Schulz & Heusch, 2000).

In unserem Mausmodell induzierten die kurzen (15 Minuten) I/R-Episoden eine globale und regionale linksventrikuläre Dysfunktion, die nach Reperfusion in WT-Tieren reversibel war, in MHC-PPAR- α -Mäusen jedoch persistierte. Der Vergleich der unveränderten globalen sowie regionalen linksventrikulären Pumpfunktion des Myokards der 0-Tage-Kontrolltiere mit dem normokinetischen Myokard der Nativmäuse bestätigte, dass das initiale Operationstrauma in dem vorliegenden Mausmodell keinen bedeutenden Effekt auf die kontraktile Myokardfunktion ausübte. Diese Befunde bestätigen u.a. die Annahme, dass die ventrikuläre Dysfunktion nach den I/R-Ereignissen ausschließlich auf das I/R-Ereignis, und nicht das Operationstrauma, zurückzuführen ist.

Die höhere Überlebensrate nach Initialoperation bei den MHC-PPAR- α -Mäusen im Gegensatz zu den WT-Mäusen lässt sich mit einer chirurgischen Lernkurve erklären. Zu den Hauptkomplikationen der Initialoperation zählten Pneumothorax durch mechanische Verletzung der Lunge sowie massive Blutung durch akzidentielle Verletzung der Arteria thoracica interna. In beiden Fällen verstarben die Mäuse meist während oder unmittelbar nach der initialen Operation zur Implantation der LAD-Ligatur. Aufgrund der wachsenden chirurgischen Routine konnten diese Komplikationen im Laufe der Studie weitgehend vermieden werden. Nach Routinierung der operativen Technik an den WT-Mäusen ging daher die Initialoperation an den MHC-PPAR- α Mäusen mit einer geringeren Sterberate einher. Die viel höhere Überlebensrate bei den Eingriffen zur Induktion der I/R ist dadurch bedingt, dass der hierzu erforderliche chirurgische Eingriff um vieles weniger invasiv und somit weniger riskant war als die initiale Operation.

5.2 Die Rolle des PPAR- α in der Regulation des myokardialen Metabolismus während repetitiver Ischämie und Reperfusion

In den MHC-PPAR- α -Mäusen war die PPAR- α -Expression ca. 130-fach erhöht (Finck et al., 2002). MHC-PPAR- α -Mäuse weisen eine erhöhte myokardiale Aufnahme von Fettsäuren, eine verminderte Expression von Genen, die in Signalwegen der Glukoseverwertung involviert sind, und eine wesentlich geringere Aufnahme von ^{18}F -Desoxyglukose auf, vergleichbar mit diabetischen Herzen (Finck et al., 2002). Wir konnten die von Dewald et al. (Dewald et al., 2005b) postulierte Herunterregulation von PPAR- α durch kurze repetitive I/R auch in MHC-PPAR- α Mäusen bestätigen. Außerdem konnten wir die schädlichen Auswirkungen der PPAR- α -Aktivierung im ischämischen Myokard nachweisen: MHC-PPAR- α Mäuse zeigten kleine, umschriebene Arealen mit Kardiomyozytenverlust, sog. Mikroninfarkten, analog zu den Befunden bei Dewald et al. (Dewald et al., 2005). Ergänzend hierzu präsentierten die MHC-PPAR- α Mäuse erhöhte Glykogenablagerungen vor allem in Mikroinfarktarealen im Vergleich zu den WT-Mäusen, wo es zu weniger Glykogenablagerungen kam. Vorangegangene Studien berichteten, dass ein gesteigerter kardialer Glykogengehalt mit erhöhter Kardiomyozytensterblichkeit korreliert (Liang et al., 2011; Younce et al., 2010). Schlussfolgernd untersuchten wir Signalkaskaden der Apoptose und konnten anhand von TUNEL-Assay und Färbung von „cleaved“ (aktivierter) Caspase-3 nachweisen, dass es bereits nach 3 Tagen repetitiver I/R zu einem erhöhten Zelltod in MHC-PPAR- α Mäusen kommt. Dies korreliert auch mit der persistierenden linksventrikulären Dysfunktion in MHC-PPAR- α Mäusen.

Deswegen scheint nicht nur die Lipotoxizität, sondern auch die pathologisch vermehrte und toxische Glykogenakkumulation im Myokard zum irreversiblen Kardiomyozytenverlust beizutragen, welche eine Reversibilität der ischämischen Kardiomyopathie in unserem Mausmodell des hibernierenden Myokards in MHC-PPAR- α Mäusen verhindert.

5.3 Kardiomyozytäre Adaptationsmechanismen – oxidativer Schutz und Adaptation der kontraktilen Elemente

Ischämischer Stress und die gesteigerte Freisetzung von Sauerstoffradikalen verursachen u.a. DNA-Einzelstrangbrüche und führen damit ebenfalls zur Apoptose von Kardiomyozyten (Akki et al., 2009; Yeh et al., 2003). Da die ROS-Produktion im repetitiven I/R-Mausmodell nachweislich gesteigert ist (Dewald et al., 2003, 2005b), wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression antioxidativer Mediatoren gemessen. Hierbei fanden wir eine verminderte mRNA-Expression von RAC-1 sowie eine verminderte Proteinexpression von HMOX-1 in MHC-PPAR- α Mäusen (Duerr et al., 2014a). Zwar war die Genexpression des antioxidativen Enzyms HMOX-1 in MHC-PPAR- α -Mäusen im Vergleich zu WT ähnlich, allerdings war die Translation in Protein in MHC-PPAR- α -Mäusen gestört. RAC-1 ist in verschiedenen zellulären Abläufen wie die Regulation des Zellwachstums involviert und spielt auch in der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und dadurch ROS-Freisetzung eine Rolle (Akki et al., 2009; Aktories et al., 1997; Dusi et al., 1995; Hall et al., 1998). Im ischämischen Mäuseherzen reduziert die Inhibition von RAC-1 signifikant die ROS-Produktion und beschreibt damit einen kardioprotektiven Mechanismus (Wang et al., 2012). Die mitochondriale Substratoxidation ist ein entscheidender intrazellulärer Prozess in der Bewältigung von oxidativem Stress. Hyperglykämie und große Mengen an zirkulierenden Fettsäuren können eine vermehrte Generierung mitochondrialer ROS und eine zelluläre Dysfunktion verursachen (Bonfont-Rousselot, 2002; Schrauwen & Hesslink, 2004). Vor diesem Hintergrund kann die reduzierte Induktion von RAC-1 als kompensatorischer Mechanismus zur Unterdrückung einer vermehrten ROS-Produktion in MHC-PPAR- α -Herzen gedeutet werden. Jedoch war der verminderte antioxidative Schutz durch fehlende HMOX-1 Proteinsynthese sowie die vermehrte Glykogenablagerung im Gewebe sicherlich ein Faktor, welcher zu gesteigerter Apoptose und damit Ausbildung von Mikroinfarkten in MHC-PPAR- α -Mäusen führte. Unsere Daten stehen im Einklang mit oben beschriebenen Studien und weisen daher auf einen fehlerhaften antioxidativen Schutz bei PPAR- α Überexpression hin.

Es wurde bereits gezeigt, dass repetitive I/R-Episoden auch zu einer myokardialen Adaption durch Modulation der Genexpression der Myosin-Isoformen führen (Dewald

et al., 2003, 2004, 2005a,b). Normalerweise sind $\leq 10\%$ des Myosins durch den β -Subtyp der „Myosin heavy chains“ bestimmt. Nach Ischämie kommt es zu einer Umstellung der Myosin-Isogenexpression, die in einem Anstieg des Verhältnisses der MHC- β - zu MHC- α -Expression resultiert (Duerr et al., 2014 a,b). Das nun überwiegend im Myosin befindliche MHC- β hat im Gegensatz zu MHC- α eine verminderte ATPase-Aktivität, was die reduzierte Kontraktionsgeschwindigkeit, aber auch die effizientere Krafterzeugung im Herzen bewirkt (Pope et al., 1980). Diese Veränderung der Zusammensetzung des Myosins wird als kardiomyozytärer Adaptationsmechanismus interpretiert, der zu einem geringeren Energieverbrauch und dadurch besserem Überleben der Zellen führt (Swynghedauw, 1986). Wir konnten nachweisen, dass die MHC-PPAR- α -Mäuse im Gegensatz zu WT-Herzen nicht in der Lage waren, diesen Wechsel der MHC-Isoformen zu vollziehen, was zu vermehrter „Überarbeitung“ der Kardiomyozyten und zu deren Schädigung führen könnte.

Zusammengefasst können alle oben genannten Befunde zu dem beschriebenen Kardiomyozytenverlust verbunden mit der signifikant schlechteren linksventrikulären Funktion der MHC-PPAR- α -Mäuse führen. Es ist aufgrund unserer Daten anzunehmen, dass die MHC-PPAR- α -Mäuse keine Möglichkeit der funktionellen Erholung nach diskontinuierlichem I/R-Protokoll aufweisen, welches in WT-Mäusen nachgewiesen wurde (Dewald et al., 2003), oder nach Revaskularisation des menschlichen hibernierenden Myokards (Frangogiannis et al., 2002a).

5.4 Initiierung des Entzündungsprozesses

Die inflammatorische Reaktion des ischämischen Myokards induziert und fördert den Gewebeumbau, welcher mit Ausbildung einer stabilen Narbe beendet ist (Frangogiannis et al., 1998a). Die Entzündungsreaktion folgt einer Chemokin- und Zytokinkaskade, bei der verschiedene Zellen beteiligt sind, die wiederum unterschiedliche Mediatoren produzieren und sezernieren um eine zelluläre Kommunikation und inflammatorische Reaktion zu ermöglichen (Frangogiannis et al., 1998b, 2002a,b,c; Dewald et al., 2005a). Weil repetitive I/R nachweislich zu einer transienten Inflammationsreaktion führt (Dewald et al.,

2003), haben wir in der vorliegenden Arbeit diese molekularen und zellulären Effekte der Entzündungskaskade untersucht, die mit der Ausbildung von Mikroinfarkten in MHC-PPAR- α Mäusen einhergehen.

Dewald et al zeigten, dass die Inflammation nach repetitiver, kurzer I/R chemokingetriggert ist (Dewald et al., 2005a). Chemotaktische Reizstoffe wie CCL2 und CCL4 bewirken die Infiltration des reperfundierten ischämischen Areals mit Makrophagen und Monozyten (Dewald et al 2005a; Hahne et al., 1993; Frangogiannis, 2004) und spielen damit eine entscheidende Rolle in der Initiierung des Entzündungsprozesses, wohingegen CCL3 eine entscheidende Rolle in der Neutrophilenattraktion zugesprochen wird (Maurer & von Stebut, 2004). Aber auch TNF- α und IL-1 β zählen zu den proinflammatorischen Zytokinen, die vermehrt nach Zelluntergang exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass CCL2 lediglich in WT-Mäusen nach I/R signifikant induziert wird, nicht jedoch in MHC-PPAR- α -Mäusen. Dieselbe Kinetik wies auch die CCL4-Expression auf. Es konnte eine chemokininduzierte Inflammation vor allem durch CCL3 nach 3 Tagen I/R durch bei PPAR- α Überexpression bestätigt werden. Diese molekularen Ereignissen sind gefolgt von Zelleinwanderung (Frangogiannis et al., 2002c). Inflammatorische Zellen vermitteln zytotoxische Effekte durch die Sekretion proteolytischer Enzyme, während sie gleichzeitig für den Abtransport des nekrotischen Gewebematerials verantwortlich sind.

Dieser Zeitverlauf entspricht der Progredienz des Gewebeumbaus und macht die besondere Wichtigkeit dieser Initiierung des Entzündungsprozesses durch Rekrutierung und Extravasation von monozytären Zellen und damit auf die Fibrose deutlich. Wir fanden eine signifikante Erhöhung und Prolongierung der Makrophagenakkumulation in MHC-PPAR- α -Herzen nach 7 Tagen I/R im Vergleich zur den WT-Mäusen. Korrelierend mit der gesteigerten Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten in Mikroinfarktgebieten zeigten die Makrophagen eine starke Affinität bei PPAR- α Überexpression, in diese Areale einzudringen. Der vermehrte Kardiomyozytenuntergang kann vor dem Hintergrund der Chemotaxis neben der CCL3- und -4 Induktion als adäquater Reiz für die Makrophagenakkumulation in diesen Mikroinfarktgebieten betrachtet werden.

Die Initiierung der Auflösung inflammatorischer Prozesse – die u.a. durch Induktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 gesteuert werden – scheinen unter der kardiomyozytenspezifischen Überexpression von PPAR- α jedoch intakt zu sein. Auf der anderen Seite scheint die signifikant niedrigere Expression von OPN-1 in MHC-PPAR- α -Herzen, ein Marker der Makrophagenreifung und des Gewebeumbaus (Rinckel et al., 2005; Rittling, 2011), mit der verlängerten Makrophagenaktivität in Mikroinfarkten assoziiert zu sein und unterstreicht zugleich die verspätet einsetzende Auflösung der Entzündungsreaktion.

5.5 Die PPAR- α -Überexpression führt zum prolongierten Gewebeumbau

Der inflammatorischen Chemokin- und Zytokinkaskade schließt sich die proliferative Phase an, in welcher der Abbau des inflammatorischen Infiltrates erfolgt, während Granulationsgewebe durch von Makrophagen und Monozyten sezernierte Mediatoren sowie durch Fibroblasten produziertes Kollagen entsteht. Aktivierte Myofibroblasten übernehmen nach einem Ischämieereignis die Hauptproduktion des Kollagens (Cleutjens et al., 1995). Sie exprimieren „Alpha-Smooth-Muscle-Actin“ (α -SMAc) und das matrizelluläre Protein Tenascin, einen regulativen Marker für den aktiven Gewebeumbau (Frangogiannis et al., 2002c). Tenascinexpression wird nur bei pathologischen Zuständen wie u.a. beim Myokardinfarkt sowie beim hibernierenden Myokard exprimiert (Imanaka-Yoshida et al., 2001). Der Kardiomyozytenverlust, wie er nach myokardialem Infarktgeschehen auftritt, führt zur Myofibroblastendifferenzierung und starken Akkumulation dieser Zellen in geschädigte Areale während der Narbenbildung (Duerr et al., 2011). Unsere Daten zeigen eine PPAR- α abhängige Myofibroblastenakkumulation in den Mikroinfarktarealen, was mit der dort auch vermehrten Kollagenablagerung und Ersatzfibrose korreliert. Als Ersatzfibrose bezeichnet man eine Bindegewebsvermehrung bei Parenchymverlust. Hierbei werden nekrotische Kardiomyozyten des ursprünglich ischämischen Myokardgewebes durch Kollagenfasern ersetzt und zu einer bindegewebigen stabilen Narbe organisiert (Weber et al., 1993). Dieser Untergang der Kardiomyozyten geht mit dem irreversiblen Verlust der ventrikulären Pumpfunktion einher, was unsere Daten in PPAR- α überexprimierenden Mäusen rekapitulieren. Die verminderte Expression von Tenascin C in MHC-

PPAR- α -Mäusen ist hierbei vornehmlich als Zeichen eines verspäteten, zu dem Zeitpunkt 3 Tage I/R noch nicht ausgeprägten myokardialen Gewebeumbaus in diesen Mäusen zu interpretieren. Die vermehrten α -SMAC+ aktivierten Myofibroblasten sind als Indiz für den aktiven verlängerten Gewebeumbauprozess in MHC-PPAR- α Herzen, vornehmlich in Arealen des Mikroinfarktes, anzusehen.

5.6 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht die Langzeitauswirkungen der kardiomyozyten-spezifischen PPAR- α -Überexpression nach diskontinuierlicher repetitiver I/R betrachtet. Aufgrund der Ausbildung von Mikroinfarkten und der diabetischen Myokardpathologie in MHC-PPAR- α -Mäusen ist jedoch anzunehmen, dass im Gegensatz zu einer vollständigen Normalisierung der ventrikulären Funktion in WT-Mäusen dies in MHC-PPAR- α -Mäusen nicht erwartet werden kann. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit vornehmlich die Genexpression und nicht die Proteinexpression überprüft, da die meisten der betrachteten Gene auf Transkriptionsebene reguliert werden und dies ihre Interaktion auf Proteinebene widerspiegeln sollte. Ergänzend hierzu können themenabhängig weitere Informationen aus der durchgeführten Immunhistochemie entnommen werden.

5.7 Zusammenfassung

Ziel unserer Arbeit war es, die Rolle der kardiomyozytenspezifischen Überexpression des PPAR- α auf die Inflammationsreaktion während ischämischer Kardiomyopathie mit Charakteristika des hibernierenden Myokards in unserem Mausmodell der repetitiven I/R zu untersuchen. Dazu wurden in einer Initialoperation die LAD-Ligatur implantiert und nachfolgend der Eingriff zur Induktion der 15-minütigen Ischämie-Episoden mit anschließender Reperfusion über einen Zeitraum von 3 und 7 Tagen an WT C57BL/6J-Mäusen und transgenen Mäusen mit MHC-spezifischer Überexpression von PPAR- α (MHC-PPAR- α) durchgeführt. Die entnommenen wurden Mäuseherzen histologisch und molekularbiologisch untersucht. Dewald et al. wiesen die Herabregulation von PPAR- α in Herzen bei repetitiver I/R in Wildtypmäusen nach, welche einen kardioprotektiven Mechanismus darstellt und in einem Substratwechsel von Fettsäuren zu Glukose resultiert. Dieser verbessert die Energieeffizienz im Herzen und reduziert den fettsäurenvermittelten oxidativen Stress. In den Herzen der MHC-PPAR- α Mäuse war der dieser Substratwechsel gestört und es kam zu vermehrter Glykogenablagerung im Gewebe. Dieser Zustand mit verminderter Glukoseutilisation ist dem diabetischen Herzen ähnlich. Unsere Ergebnisse gewähren neue Einsicht in die komplexen Mechanismen des myokardialen Gewebeumbaus und Mechanismen der Kardioprotektion während einer diabetischen Stoffwechsellage im ischämischen Mäuseherzen. Die Überexpression von PPAR- α ging mit der Ausbildung von Mikroinfarkten und signifikant erhöhten Kardiomyozytenverlust in diesen Arealen nach 7 Tagen repetitiver I/R im Vergleich zur interstitiellen Fibrose bei WT-Mäusen einher. Die PAS-Färbungen präsentierten zudem eine verstärkte Glykogenakkumulation in den mikroinfarzierten Arealen in MHC-PPAR- α Mäusen, was Kardiomyozytenschädigung hervorruft. Als weitere Ursache des Kardiomyozytenverlustes konnten wir den eingeschränkten antioxidativen Schutz durch eine verminderte HMOX-1 Proteinexpression und reduzierte RAC-1 mRNA Induktion bei PPAR- α Überexpression nachweisen. Außerdem wurde die fehlende Adaptation der kontraktilen Elemente in diesen Mäusen durch Untersuchungen der mRNA-Expression der MHC-Isoformen demonstriert: MHC-PPAR- α Mäuse waren nicht in der Lage, das Verhältnis der Genexpression von energetisch ungünstiger α -MHC-Induktion zugunsten der weniger ATP-verbrauchenden β -Isoform umzustellen. All diese Befunde gingen mit einer schlechteren linksventrikuläre Pumpfunktion in MHC-

PPAR- α Mäusen nach 7 Tagen einher. Zudem wurde die Beteiligung der Inflammation durch Untersuchung der Expression von Chemokinen und Zytokinen in WT- und MHC-PPAR- α Mäusen untersucht. Die ischämische Schädigung führte in MHC-PPAR- α Tieren zu einer inflammatorischen Kaskade, welche vorwiegend durch die Chemokine CCL3 und CCL4 angetrieben wurde und eine wesentlich stärkere Makrophagen- und Neutrophileninfiltration nach sich zog. Dennoch schien der Stimulus für eine Auflösung der Inflammation in beiden Genotypen intakt zu sein. Trotzdem akkumulierte die Mehrzahl der Makrophagen in die mikroinfarzierten Bereiche, wobei es sich um unreifere Makrophagen als in WT zu handeln schien, da die MHC-PPAR- α Herzen eine signifikant geringere Genexpression des Makrophagenreifungsfaktors OPN-1 aufwiesen. Da OPN-1 auch eine Schrittmacherfunktion im Gewebeumbau der extrazellulären Matrix während I/R besitzt, könnte dies für die stark reduzierte TNC-Induktion und damit den verzögerten Gewebeumbauprozess bei diesen Mäusen verantwortlich sein. Dieser sich anschließende kardiale Gewebeumbau trat verzögert ein und war verlängert und ging mit einer signifikanten Myofibroblastenakkumulation in Mikroinfarktareale bei PPAR- α Überexpression einher, welche wir in den α -SMAC-gefärbten Präparaten untersuchten. Im Einklang mit diesen Befunden war die Tenaczin-C mRNA Expression, ein Marker des frühen Gewebeumbaus, in MHC-PPAR- α Mäusen signifikant niedriger als in WT-Mäusen. Die Bereiche des Kardiomyozytenverlustes – Mikroinfarkte – wurden in der Folge durch Ersatzfibrose ausgefüllt. Die vermehrte Kollagenablagerung in den mikroinfarzierten Arealen der MHC-PPAR- α Mäusen resultierte in verstärkter Narbenbildung und verschlechterter linksventrikulärer Pumpfunktion in diesen Herzen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Die Initiierung der Auflösung inflammatorischer Prozesse untersuchten wir durch Messung der IL-10 mRNA-Expression, welche unter der kardiomyozytenspezifischen Überexpression von PPAR- α jedoch intakt zu sein schien. Diese Resultate lassen einen neuen möglichen Zusammenhang zwischen dem PPAR- α -System, der inflammatorischen Reaktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion und dem myokardialen Gewebeumbau im diabetischen Herzen plausibel erscheinen.

6. Ausblick

Obwohl die Prognose der Patienten mit koronarer Herzerkrankungen in den letzten Jahren verbessert werden konnte, haben kardiovaskuläre Erkrankungen immer noch eine außergewöhnlich hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate (Sarma et al., 2012). Gegenwärtige immunmodulatorische Therapieansätze zielen in erster Linie darauf ab, die hormonelle Signalkaskade zu blocken und hämodynamische Parameter am Herzen zu stabilisieren. Diabetes mellitus Typ 2 stellt eine der wichtigsten Komorbiditäten im Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Asghar et. al, 2009; Duerr et al, 2014a). PPAR- α -Agonisten wurden bereits in Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus und Patienten mit prädiabetischer Insulinresistenz mit signifikant erhöhten HbA(1c) und Glukosespiegel therapeutisch eingesetzt (Jay & Ren, 2007). Nach den zahlreichen histologischen und immunhistochemischen Nachweisen kardiotoxischer Effekte durch Aktivierung von PPAR- α - ist eine strenge Indikation des Einsatz solcher Agonisten jedoch zumindest bei Patienten mit diabetogener Stoffwechsellage und metabolischen Syndrom im klinischen Gebrauch unabdingbar. Unsere Arbeit konnte zeigen, dass eine diabetische Stoffwechsellage, wie sie durch PPAR- α Überexpression hervorgerufen wurde, dem postischämischen Gewebeumbau abträglich sind. Außerdem konnten wir eine wichtige Rolle für OPN-1 und TNC in der Limitierung des Gewebeumbaus mit Narbenbildung nachweisen. Ein wichtiges Ziel ist es nach wie vor Behandlungsmethoden zu entwickeln, die myokardialen Zelluntergang vermindern und den Heilungsprozess nach ischämischen Ereignissen fördern und optimieren können. Ein möglicher Ansatz weiterer Forschungsbemühungen stellt damit die Untersuchung der Rolle von OPN-1 und Tenascin C in – auch in Hinblick auf diabetische Myokardpathologie – dar.

7. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Ventrikulogramm	16
Abbildung 2:	Schema der Aktivierung der PPAR's-Rezeptoren nach Bishop-Bailey et al. (Bishop-Bailey, 2000)	21
Abbildung 3:	Verlauf der Initialoperation, Implantation der LAD-Ligatur	27
Abbildung 4:	Skizzierte Darstellung des Versuchsaufbaus der täglichen I/R	28
Abbildung 5:	EKG-Aufzeichnung (Ableitung II) zur Kontrolle der täglichen Ischämie und Reperfusion	29
Abbildung 6:	Trennung von Reporter und Quencher durch Polymerase eines fluoreszierenden Markers	48
Abbildung 7:	Expression von PPAR- α mRNA in MHC-PPAR- α -Mäusen	53
Abbildung 8:	Histologie des reperfundierten ischämischen Myokards bei WT- und MHC-PPAR- α -Mäusen	54
Abbildung 9:	Glykogenmessung in PAS-gefärbten Schnitten	55
Abbildung 10:	Caspase-3-Färbung zur Detektierung apoptotischer Kardiomyozyten	56
Abbildung 11:	mRNA-Expression der Caspase-8,, BCL-2, HMOX-1, und RAC-1 und Proteinexpression von HMOX-1 und RAC-1	57-58
Abbildung 12:	Bestimmung der ventrikulären Pumpfunktion	59-60
Abbildung 13:	MHC- α - und β -mRNA-Expression während des I/R Protokolls	61
Abbildung 14:	MAC-2 Färbung zur Detektierung von Makrophagen	62-63
Abbildung 15:	Vergleich der mRNA-Expression inflammatorischer Mediatoren	64-65
Abbildung 16:	Vergleich der mRNA-Expression der Zytokine	66
Abbildung 17:	Gesamte Kollagenfläche und Kollagenfläche in Mikroinfarkten	67

Abbildung 18: Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand in WT und MHC-PPAR- α nach 7 Tagen I/R mittels Sirius-Rot-Färbung	68
Abbildung 19: α SMAC-Färbung zur Detektierung des kardialen Gewebeumbaus	69
Abbildung 20: TNC-Färbung zur Bestätigung eines frühen Gewebeumbaus	70
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Rolle von PPAR- α im ischämischen Herzen	71

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des Master Mix für die Umschreibung der cDNA	45
Tabelle 2:	Temperaturzyklus für die cDNA-Synthese.	46
Tabelle 3	Zusammensetzung des Master Mix für die qRT-PCR.	50

9. Literaturverzeichnis

- Akki A, Zhang M, Murdoch C, Bremer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47: 15–22
- Aktories K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin Invest* 1997; 99: 827–829
- Allen JW, Cox TA, Kloner RA. Myocardial stunning: a post-ischemic syndrome with delayed recovery. *Exs* 1996; 76: 443–452
- Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, Udelson, JE. Myocardial viability testing and impact of revascularisation on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39: 1151–1158
- Asghar O, et al., Diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116: 741–760
- Ausma J, Cleutjens J, Thone F, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995a; 147: 35–42
- Ausma J, Furst D, Thone F, Shivalkar B, Flameng W, Weber K. Molecular changes of titin in left ventricular dysfunction as a result of chronic hibernation. *J Mol Cell Cardiol* 1995b; 27: 1203–1212
- Ausma J, Schaart G, Thone F. Chronic ischemic variable myocardium in man: aspects of dedifferentiation. *Cardiovasc Pathol* 1995c; 4: 29–37
- Bager PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 238–245
- Birnbaum Y, Leor J, Kloner, RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1997; 4: 185–195
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *B J Pharmacol* 2000; 129: 823–834
- Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609–634
- Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 561-568
- Borgers M, Thone F, Wouters L, Ausma J, Shivalkar B, Flameng W. Structural correlates of regional myocardial dysfunction in patients with critical coronary artery stenosis: chronic hibernation? *Cardiovasc Pathol* 1993; 2: 237–245
- Bulhak AA, Sjöquist PO, Xu CB, Edvinsson L, Pernow J. Protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury by PPAR-alpha activation is related to production of nitric oxide and endothelin-1. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 244–252
- Camici PG, Wijns W, Borgers M, De Silva R, Ferrari R, Knuuti J. Pathophysiological mechanisms of chronic left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium). *Circulation* 1997; 96: 3205-3214

- Carson FL. Histotechnology. A Self Instructional Text. 1996; ASCP Press, Chicago
- Chen C, Li L, Chen LL, Preda JV, Chen MH, Fallon ST, Gillam L. Incremental doses of dobutamine induce a biphasic response in dysfunctional left ventricular regions subtending coronary stenoses. *Circulation* 1995; 92: 756–766
- Chen C, Chen L, Fallon JT, Ma L, Li L, Bow L, Waters DD. Functional and structural alterations with 24-hour myocardial hibernation and recovery after reperfusion. A pig model of hibernation myocardium. *Circulation* 1996; 94: 507–516
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Staels B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-25580
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflam Res* 2000; 49: 497–505
- Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Schaffer JE. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001; 107: 813-822
- Chiu HC, Kovacs A, Blanton R, Han X, Courtois M, Weinheimer C, Schaffer JE. Transgenic expression of FATP1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2005; 96: 225-233
- Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325–338
- Devehand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39–43
- Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700-2705
- Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, Duerr GD, Taffet G, Michael LH, Welz A, Entman ML. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 52: 305–311
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005a; 96: 881-889
- Dewald O, Sharma S, Adroque J, Duerr GD, Crapo JD. Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated-Receptor-(alpha) Gene Expression in a Mouse Model of Ischemic Cardiomyopathy Is Dependent on Reactive Oxygen Species and prevents Lipotoxicity. *Circulation* 2005b; 112: 407–415
- Diamond GA, Forrester JS, deLuz PL, Wyatt HL, Swan HJ. Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978; 95: 204–209

Duerr GD, Elhafi N, Bostani T, Ellinger J, Swieny L, Kolobara E, Welz A, Dewald O. Comparison of Myocardial Remodeling between Cryoinfarction and Reperfused Infarction in Mice. *J Biomed Biotechnol* 2011; 28: 1-10

Duerr GD, Heinemann JC, Arnoldi VI, Feisst A, Kleiy J, Ghanem A, Welz A, Dewald O. Cardiomyocyte specific peroxisome proliferator-activated receptor- α overexpression leads to irreversible damage in ischemic murine heart. *Life Sci* 2014a; 102: 88-97

Duerr GD, Heinemann JC, Suchan G, Kolobara E, Wenzel D, Geisen C, Matthey M, Pässe-Tietjen K, Mahmud W, Ghanem A, Tiemann K, Alferink J, Burgdorf S, Buchalla R, Zimmer A, Lutz B, Welz A, Fleischmann BK, Dewald O. The endocannabinoid-CB2 receptor axis protects the ischemic heart at the early stage of cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2014b; 109: 425

Duerr GD, Heinemann JC, Gestrich C, Heuft T, Klaas T, Keppel K, Roell W, Klein A, Zimmer A, Velten M, Kilic A, Bindila L, Lutz B, Dewald O. Impaired border zone formation and adverse remodeling after reperfused myocardial infarction in cannabinoid CB2 receptor deficient mice. *Life Sci* 2014c; 138: 8-17

Dusi SM, Donini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1995; 308: 991–994

Elsasser A, Schlepper M, Klovekorn WP, Cai WJ, Zimmermann R, Müller, KD. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation* 1997; 96: 2920–2931

Elsasser A, Schlepper M, Schaper J. Clinical and morphologic findings in the "hibernating myocardium". *Z Kardiol* 1995; 84: 107–114

Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induces oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992; 90: 1335-1345

Entman ML and Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311

Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, Kurrelmeyer K, Mann DL, Smith CW. Is inflammation good for the ischemic heart – perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: 82–87

Fallavollita JA, Perry BJ, Canty JM. ¹⁸F-2-deoxythologyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium. *Circulation* 1997; 95: 1900–1909

Fedele FA, Gewirtz H, Capone RJ, Sharaf B, Most AF. Metabolic response to prolonged reduction of myocardial blood flow distal to a severe coronary artery stenosis. *Circ* 1988;78:729–735

Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002; 109: 121–130

- Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW, Kelly DP. A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1226–1231
- Finck BN. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 269–277
- Flotte TJ, Springer TA, Thorbecke GJ. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol* 1983; 111: 112–124
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelmann BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995; 83: 803–812
- Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey MH, Ballantyne C. M. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circ* 1998a; 98: 687–698
- Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998b; 30: 2567–2576
- Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002a; 39: 1468-1474
- Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, Reardon MJ, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002b; 160: 1425-1433
- Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovas Res* 2002c; 53: 31–47
- Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 2004; 53: 585–595
- Frangogiannis NG, Dewald O, Xia Y, Ren G, Haudek S, Leucker T, Kraemer D, Taffet G, Rollins BJ, Entman ML. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2007; 115: 584-592
- Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Bartunek J, Melin JA. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused noninfarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1939-1946
- Grannemann J, Skoff R, Yang X. Member of peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1998; 51: 563-573

- Hacker TA, Renstrom B, Nellis SH, Liedtke AJ. Effect of repetitive stunning on myocardial metabolism in pig hearts. *Am J Physiol* 1997; 273: 1395-1402
- Hafstad AD, Khalid AM, Hagve M, Lund T, Larsen TS, Severson DL, Clarke K, Berge RK, Aasum E. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation causes increased fatty acid oxidation, reducing efficiency and post – ischaemic functional loss. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 519-526
- Hahne M, Jäger U, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D. Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* 1993; 121: 655-664
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509–514
- Heusch G. Hibernating Myocardium. *Physiol Rev* 1998; 78: 1055–1085
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993; 11: 1026-1030
- Imanaka-Yoshida K, Matsuura R, Isaka N, Nakano T, Sakakura T, Yoshida T. Serial extracellular matrix changes in neointimal lesions of human coronary artery after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical significance of early tenascin-C expression. *Virchows Arch* 2001; 439: 185-190
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645–650
- Jay MA and Ren J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2007; 3: 33-39
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 68–78
- Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury – changes in cell volume, electrolytes, metabolites and ultrastructure. *Circ Res* 1985; 56: 262-278
- Jiang C., Ting AT, Seed B. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86
- Kim SJ, Peppas A, Hong SK, Yang G, Huang Y, Diaz G, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF. Persistent stunning induces myocardial hibernation and protection: flow/function and metabolic mechanisms. *Circ Res* 2003; 92: 1233–1239
- Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis-retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358: 771–774
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508

- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97: 1848–1867
- Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, Shook T, Pollick C, Burstein S. Evidence for stunned myocardium in humans. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 349-356
- Kloner RA and Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001a; 104: 2981–2989
- Kloner RA and Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001b; 104: 3158–3167
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* 1989; 264: 6427-6437
- Liang JL, Feng ZK, Liu XY, Lin QX, Fu YH, Shan ZX, Zhu JN, Lin SG, Yu XY. Effect of impaired glucose tolerance on cardiac dysfunction in a rat model of prediabetes. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 734–739
- Liedtke AJ, Renstrom B, Nellis SH, Hall JL, Stanley WC. Mechanical and metabolic functions in pig hearts after 4 days of chronic coronary stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 815–828
- Lopaschuk GD and Spafford M. Response of isolated working hearts to fatty acids and carnitine palmitoyltransferase I inhibition during reduction of coronary flow in acutely and chronically diabetic rats. *Circ Res* 1989; 65: 378–387
- Lopaschuk GD, Warmbolt RD, Barr RL. An imbalance between glucolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *J Pharmacol Exp Therap* 1993; 264: 135–144
- Maurer M and von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36: 1882-1886
- McNulty P, Jagasia D, Cline G, Ng C, Whiting J, Garg P, Soufer R. Persistent changes in myocardial glucose metabolism in vivo during reperfusion of a limited -duration coronary occlusion. *Circulation* 2000; 101: 917–922
- Michael LH, Lewis RM, Brandon TA, Entman ML. Cardiac lymph flow in conscious dogs. *Am J Physiol* 1979; 237: 311-317
- Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: 2147–2154

Michael LH, Entman ML, Gersch L, Dewald O, Zoerlein M. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 41–49

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2015 Jan 27; 131: 29-322

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136

Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1996; 145: 1450-1462

Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog Cardiovasc Dis* 1972; 15: 289–329

Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, Peschon J, Mann DL, Michael LH, Entman ML. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF- α -independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2549-2558

Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E. Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 1988; 108: 626–628

Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in PPAR α -deficient mice. *J Biol Chem* 1997; 272: 27307–27312

Pope B, Hoh JF, Weeds A. The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Lett* 1980; 118: 205-208

Powledge TM. The polymerase Chain Reaction. *Adv Physiol Educ* 2004; 28: 44-50

Przyklenk K, Bauer B, Kloner RA. Reperfusion of hibernating myocardium: contractile function, high-energy phosphate content, and myocyte injury after 3 hours of sublethal ischemia and 3 hours of reperfusion in the canine model. *Am Heart J* 1992; 123: 575–588

Rahimtoola SH. Coronary bypass-surgery for chronic angina. A perspective. *Circulation* 1982; 65: 225–241

Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: 123–135

Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 1989; 117: 211–221

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Biochemie, Thrombusbildung und Ischämie. Stuttgart: Duale Reihe, Thieme, 2008: 751-753

- Razeghi P, Young ME, Abbasi S, Taegtmeyer H. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2001a; 287: 5-10
- Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeyer H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 2001b; 104: 2923–2931
- Reimer KA, Van der Heide RS, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol* 1993; 72: 13G–21G
- Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for Rac in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 118–122
- Rittling SR. Osteopontin in macrophage function. *Exp Rev Mol Med* 2011; 13: e15
- Ross J Jr. Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation* 1991;83:1076–1083
- Ruiz VG and Soler EP. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev* 2010; 6: 138–149
- Sarma S, Ardehali H, Gheorghiade M. Enhancing the metabolic substrate: PPAR-alpha agonists in heart failure. *Heart Fail Rev* 2012; 17: 35-43
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 281–287
- Schaper J. Pathophysiology and Rational Pharmacotherapy of Myocardial Ischemia. Heusch G, ed. Darmstadt: Steinkopff, 1990; 11–36
- Schaper W, Remijnsen P, Xhonneux R. The size of myocardial infarction after experimental coronary artery ligation. *Z Kreislaufforschung* 1969; 58: 904-909
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1302: 93–109
- Schrauwen P and Hesslink M. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1412–1417
- Schulz R and Heusch G. Hibernating myocardium. *Heart* 2000; 84: 587–594
- Schwaiger M, Schelbert HR, Ellison D, Hansen H, Yeatmann L, Vinten-Johansen J, Phelps ME. Sustained regional abnormalities in cardiac metabolism after transient ischemia in the chronic dog model. *Journal of the Am Coll Cardiol* 1985a; 6: 336–347
- Schwaiger M, Schelbert HR, Keen R, Vinten-Johansen J, Hansen H, Selin C, Phelps ME. Retention and clearance of C-11 palmitic acid in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1985b; 6: 311–320

- Sharifpanah F, Wartenberg M, Hannig M, Piper HM, Sauer H. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists enhance cardiomyogenesis of mouse ES cells by utilization of a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Stem Cells* 2008; 26: 64–71
- Shen YT and Vatner SF. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs. Hibernation versus stunning. *Circ Res* 1995; 76: 479–488
- Smeets PJ., Planvilla A, van der Vusse GJ, van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: take it to heart. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 191: 171–188
- Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1998; 21: 885–887
- Swynghedauw, B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* 1986; 66: 710–711
- Taegtmeyer H. Switching metabolic genes to build better heart. *Circulation* 2002; 106: 2043–2045
- Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011; 2: 236–240
- Valasek MA and Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Ed* 2005; 29: 151–159
- Wang X, Zhu H, Zhang X, Liu Y, Chen J, Medvedovic M, Li H, Weiss MJ, Ren X, Fan GC. Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 379–390
- Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Pisano B, Chatterjee PK, Thiemermann C. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J* 2002; 16: 1027–1040
- Weber T, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial Fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 341–348
- Yeh CH, Wang YC, Wu YC, Chu JJ, Lin PJ. Continuous tepid blood cardioplegia can preserve coronary endothelium and ameliorate the occurrence of cardiomyocyte apoptosis. *Chest* 2003; 123: 1647–1654
- Younce CW, Wang K, Kolattukudy PE. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP-1P. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 665–674
- Young ME, Laws FA, Goodwin GW, Taegtmeyer H. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 2001; 276: 44390–44395
- Yue TL, Bao W, Jucker BM, Gu JL, Romanic AM, Brown PJ, Cui J, Thudium DT, Boyce R, Burns-Kurtis CL, Mirabile RC, Aravindhan K, Ohlstein EH. Activation of peroxisome

proliferator-activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 2393–2399

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH
Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1784–1789

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Armin Welz danke ich für das freundliche Überlassen der Thematik und die Unterstützung dieser Arbeit.

Großem Dank verpflichtet bin ich PD Dr. med. Daniel Dürr, der mich hervorragend und in der ganzen Zeit betreut und fachlich exzellent beraten hat. Zudem möchte ich mich für die große Unterstützung während meiner Labortätigkeiten und die Korrekturen des Manuskriptes bei ihm herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Oliver Dewald möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeit danken und dass er mir während dieser Zeit ein hervorragender Berater war.

Außerdem möchte ich mich insbesondere bei Christine Peigney bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich immer mit offenen Armen im Labor empfangen hat.

Bei David Vogeler möchte Ich mich für die jahrelange private und berufliche Unterstützung herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich Dr. med. Amir Razzaghi danken, der seit dem Studium als Mentor und Freund jeder Zeit ein offenes Ohr für mich hat.

Ein besonderer Dank richtet sich an Dr. med. Oliver Wingenbach für die aufopferungsvolle private Unterstützung während der gesamten Zeit.

Bedanken möchte ich mich zudem bei meiner Schwester, Stephanie Beatrice Arnoldi, die mich immer unterstützt, an mich glaubt und stolz auf mich ist.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter und Ulli bedanken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und mir in jeder Lebenslage „Wurzeln und Flügel“ schenken.

Mein Dank richtet sich an alle, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.